



الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الزراعة
ماجستير التقانات الحيوية

تأثير مصدر الخزعة النباتية في التباين الوراثي للنباتات الناتجة عن زراعة المعلقات الخلوية
في صنفين من البطاطا

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية
ماجستير التقانات الحيوية

إعداد

خالد عبد الرزاق المحمد

المشرف العلمي

أ.د. خليل المعري

أستاذ في قسم علوم البستنة
كلية الزراعة – جامعة دمشق

المشرف المشارك

د.فهد البيسكي

باحث في الهيئة العامة
للتقانة الحيوية (NCBT)

دمشق-2016

فهرس المحتويات
Index of Contents

رقم الصفحة	المحتويات
1	الملخص باللغة العربية
4	1- المقدمة
6	1-1 واقع زراعة البطاطا في سوريا
7	2-1 مواعيد وطريقة الزراعة
7	1-2-1 عروة ربيعية
7	2-2-1 عروة صيفية
7	3-2-1 عروة خريفية
7	3-1 طريقة الزراعة
7	4-1 طرائق إكثار البطاطا
7	1-4-1 الإكثار الجنسي
7	2-4-1 الإكثار اللاجنسي
7	1-2-4-1 بالدرنات
8	2-4-1-2 بوزارة النسيج النباتية
8	5-1 مبررات البحث وأهدافه
11	2 الدراسة المرجعية
27	3 مواد البحث وطرائقه
27	1-3 مدة ومكان تنفيذ البحث
27	2-3 المادة النباتية

27	1-2-3 الصنف تشالنجر
28	2-2-3 الصنف أمارين
28	3-3 طرائق البحث
28	1-3-3 زراعة النهايات الوردية
29	2-3-3 زرع الأنسجة للخزعات النباتية
29	1-2-3-3 مرحلة الزراعة الأولية
31	2-2-3-3 مرحلة إكثار الخزعات النباتية
33	3-2-3-3 مرحلة استحداث الكالس وإكثاره
34	4-2-3-3 زرع المعلق الخلوي
35	1-4-2-3-3 تقدير الكثافة الخلوية
36	2-4-2-3-3 تقدير معدل الانقسام الخلوي
37	3-4-2-3-3 تقدير حيوية الخلايا باختبار TTC
38	5-2-3-3 مرحلة تكوين الميكروكالس وإكثاره
38	6-2-3-3 مرحلة تجديد الكالس
39	3-3-3 التوصيف الجزيئي على مستوى الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA)
39	1-3-3-3 استخلاص الدنا
41	2-3-3-3 تقدير كمية الـ DNA و نوعيته
43	3-3-3-3 التفاعل التسلسلي البوليمرازي PCR
44	4-3-3-3 الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج الـ PCR
45	5-3-3-3 التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي

47	4- النتائج والمناقشة
47	1-4 مرحلة الزراعة الأولية
47	1-1-4 التطهير السطحي والزراعة التأسيسية
49	2-1-4 مرحلة الإكثار
50	2-4 استحداث الكالس
50	1-2-4 الصنف أمارين
51	2-2-4 الصنف تشالنجر
55	3-4 زرع المعلقات الخلوية
55	1-3-4 الكثافة الخلوية
55	1-1-3-4 الكثافة الخلوية للمعلقات الخلوية للصنف أمارين
56	2-1-3-4 الكثافة الخلوية للمعلقات الخلوية للصنف تشالنجر
59	2-3-4 معدل الانقسام الخلوي
59	1-2-3-4 معدل الانقسام الخلوي لمعلقات الصنف أمارين
60	2-2-3-4 معدل الانقسام الخلوي لمعلقات الصنف تشالنجر
63	3-3-4 اختبار TTC لحيوية الخلايا
63	1-3-3-4 حيوية المعلقات الخلوية للصنف أمارين
64	2-3-3-4 حيوية المعلقات الخلوية للصنف تشالنجر
66	4-4 تجديد المعلقات الخلوية
67	1-4-4 تجديد المعلقات الخلوية بتأثير السيبتوكينين الـ BAP
67	1-1-4-4 الصنف أمارين

67	4-4-1-1 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق
67	4-4-1-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة
68	4-4-1-2 الصنف تشالنجر
68	4-4-1-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق
68	4-4-2-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة
70	4-4-2-2 تجديد المعلقات الخلوية بتأثير السيتوكينين الزياتين الـ Z
70	4-4-2-1 الصنف أمارين
70	4-4-2-1 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق
71	4-4-2-1 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة
71	4-4-2-2 الصنف تشالنجر
71	4-4-2-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق
72	4-4-2-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة
75	4-5 دراسة التغيرات الوراثية
93	4-6 تأثير منظمات النمو النباتية BAP و Z ومصدر الخزعة النباتية على التباين الوراثي بين النبات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية
93	4-6-1 الصنف أمارين
96	4-6-2 الصنف تشالنجر
100	4-7 الاستنتاجات:
102	4-8 المقترحات والتوصيات
103	4-9 المراجع العلمية
116	الملخص باللغة الإنجليزية

فهرس الجداول

Index of Tables

رقم الصفحة	محتوى الجدول	رقم الجدول
5	الإنتاج العالمي من البطاطا خلال العام 2014	1
6	مساحة وإنتاج وغلة البطاطا حسب المحافظات وتطورها على مستوى القطر خلال الفترة (2005-2014)	2
32	تركيب الوسط المغذي لموراشيج وسكوج (MS) (Murashige و Skooge، 1962) المستخدم في البحث	3
34	الأوساط المغذية وتركيب المزائج الهرمونية المستخدمة في استحداث وإكثار وتجديد الكالس	4
41	ترميز DNA العينات المدروسة للصنفين أمارين وتشالنجر	5
42	الكثافة الضوئية لعينات DNA المدروسة عند الموجتين 260 و 280 نانومتر، ونوعية الـ DNA وتركيزه	6
43	مرئسات الـ ISSR المستخدمة في تضخيم الـ DNA للعينات المدروسة	7
49	تأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم في تطهير الأجزاء النباتية لصنف البطاطا المدروسين	8
54	تأثير نوع الخزعة النباتية وتركيز الأوكسين 2,4-D في نسبة استحداث الكالس وتشكل الجذور في صنف البطاطا المدروسين	9
58	تأثير مصدر وقطر الخزعة النباتية في الكثافة الخلوية في المعلقات الخلوية في صنف البطاطا المدروسين	10
62	تأثير معدل الانقسام الخلوي في المعلقات الخلوية للخزعات النباتية في صنف البطاطا المدروسين	11
66	تأثير مصدر وقطر الخزعة النباتية في حيوية خلايا المعلقات الخلوية في صنف البطاطا المدروسين	12
70	تأثير تركيز السيتوكينين BAP في الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لصنف البطاطا المدروسين.	13
74	تأثير تركيز السيتوكينين الزياتين Z في الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لصنف البطاطا المدروسين.	14
75	تأثير منظمات النمو النباتية BAP و Z في النسبة المئوية للكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لصنف البطاطا المدروسين.	15
95	التباين الوراثي بين النبات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية للصنف أمارين	16
98	التباين الوراثي بين النبات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية للصنف تشالنجر.	17

فهرس المخططات والأشكال
Index of Charts and Figures

رقم الشكل	الموضوع	رقم الصفحة
1	درنات الصنف <i>Solanum. Tuberosum .L.C.V. Challenger Amarin</i>	27
2	درنات الصنف <i>Solanum. Tuberosum .L.C.V.Amarin</i>	28
3	زراعة النهايات الوردية لدرنات الأصناف المدروسة	29
4	تطهير العينات النباتية	30
5	نمو العينات النباتية بعد الزراعة	31
6	مخطط عام لزراعة المعلقات الخلوية وتجديدها	35
7	شريحة عد الخلايا والمجهر الضوئي المقلوب	36
8	تقدير حيوية الخلايا باختبار TTC	38
9	نوعية الـ DNA للعينات المدروسة من خلال الترحيل على هلامة الأغاروز 1%	42
10	زرع الخزعات النباتية في مرحلة الإكثار	49
11	الكالس المستحدث لأصناف البطاطا المدروسة	53
12	زرع المعلقات الخلوية لأصناف البطاطا المدروسة	57
13	منحني النمو في المعلقات الخلوية للصنف أمارين	60
14	منحني النمو في المعلقات الخلوية للصنف تشالنجر	61
15	الإنقسام الخلوي في المعلقات الخلوية	62
16	الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية على وسط يحوي BAP لصنفي البطاطا المدروسين	69
17	الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية على وسط يحوي Z لصنفي البطاطا المدروسين	73

رقم الشكل	الموضوع	رقم الصفحة
18	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr1	76
19	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr2	78
20	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr3	79
21	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr4	80
22	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr5	81
23	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr6	82
24	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr7	83
25	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr8	84
26	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr9	85
27	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr10	86
28	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr11	87
29	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr12	88
30	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr13	89
31	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr14	90
32	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr15	91
33	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr16	92
34	صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr17	93

المختصرات العلمية الواردة في الأطروحة

Abbreviations

المختصر العلمي	الاسم الإنكليزي	الاسم العربي
MS	Murashige and Skoog medium	المحلول المعدني موراشيج وسكوج
B1	Thiamin	ثيامين
BAP	6-benzyl aminopurine	6- بنزيل أمينو بيورين
BA	Benzyl Adenine	بنزيل أدنين
TDZ	Thidiazuron	تديازرون
Z	Zeatin	زياتين
2,4-D	2,4- dichlorophenoxyacetic acid	ديكلوروفينوكسي أسيتيك أسيد
NAA	Naphthalene acetic acid	نفتالين أسيتيك أسيد
IBA	3-Indolbutric acid	إندول بيوتريك أسيد
GA3	Gebberellic acid	حمض الجبرلين
TTC	2,3,5- Triphenyl Tetrazolium Chloride	تري فينيل تترازوليوم كلورايد
PCR	Polymerase Chain Reaction	التفاعل التسلسلي البوليميرازي
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid	الحمض النووي الريبسي المنقوص الأوكسجين
dNTP ₃	Deoxynucleotide Triphosphates	ديوكسينيوكلتيد تري فوسفات
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA	تقنية التضخيم العشوائي للتعدد الشكلي للدنا
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	تقنية تباين أطوال قطع الدنا المضخمة
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats	تقنية تكرارات التسلسلات البسيطة الداخلية
SSR	Simple Sequence Repeat or Microsatellites	تقنية التكرارات المتتابعة البسيطة
Pr	Primer	مريسة
MI	mitotic index	معدل الانقسام الخلوي
CTAB	Cetyl Timethyl Ammonium Bromide	ستيل تريمثيل أمونيوم بروميد

**Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agricultural
Master of Biotechnology**



**Effect of explants on genetic variability of the plantlets produced
from cell suspension in two potato cultivars**

by

Khaled Abdulrazzak Al.Mohammed

Thesis submitted to fulfillment of the requirements
Master degree In Agricultural Science
(Biotechnology)

Supervisors

Dr. Fahed Al.Biski

National Commission of Biotechnology
Damascus

Prof. Dr. Khalil Al.Maarri

Heretical Department
Faculty of Agriculture
Damascus university

Damascus- 2016

المخلص

نفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، وكلية الزراعة في جامعة دمشق، خلال العامين 2015-2016 بهدف زرع وتجديد المعلقات الخلوية لصنفين من البطاطا *Solanum tuberosum* أمارين وتشالنجر، وهما من الأصناف رباعية الصيغة الصبغية والمعتمدة محلياً في العام 2013، ثم تحديد التباين الوراثي على مستوى الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية باستخدام تقنية الـ ISSR.

جرى استحداث الكالس من الصنفين (أمارين وتشالنجر) من مصدرين مختلفين من الخزعات النباتية (الأوراق والسلاميات) في وسط الزرع Murashing and skooge (MS) مضافاً له تراكيز مختلفة من الأوكسين 2,4-D ثنائي كلوروفينوكسي حمض الخل (2,4-D)، وبينت النتائج أن التركيز الأمثل لاستحداث الكالس 3 ملغ/ل 2,4-D في الصنف أمارين من الأوراق والسلاميات 96% و 92% على التوالي، وفي الصنف تشالنجر 92% من كلا الخزعتين.

أمكن زرع معلقات خلوية بدءاً من نسيج الكالس في وسط الزرع السائل MS 1/2 مضافاً له 3 ملغ/ل 2,4-D، ودرست بعض مؤشرات النمو (الكثافة الخلوية، معدل الانقسام الخلوي، وحيوية الخلايا)، وقد بلغت المعلقات الخلوية للصنفين المدروسين مرحلة الثبات في الأسبوع الثالث من الزرع.

ازدادت الكثافة الخلوية في المعلقات الخلوية للصنفين أمارين في الأسبوع الثالث والرابع بشكل ملحوظ، في حين ازدادت بشكل تدريجي في المعلقات الخلوية للصنف تشالنجر، وقد تفوقت المعلقات الخلوية للسلاميات على مثيلاتها للأوراق عند الصنف أمارين في معدل الانقسام، بينما لم يلاحظ وجود فروق معنوية فيما بينها عند الصنف تشالنجر، كما تفوقت المعلقات الخلوية للصنف أمارين في حيوية الخلايا بالمقارنة مع الصنف تشالنجر في الأسبوعين الثالث والرابع.

استخدمت تراكيز مختلفة من منظمي النمو 6-Bezyl Aminopurine (BAP) و Zeatin (Z) لتجديد المعلقات الخلوية، أمكن الحصول على أعلى نسبة للكالس المتكون من المعلقات الخلوية لأوراق وسلاميات كلا الصنفين المدروسين باستخدام التركيز 1.75 ملغ/ل من BAP، أظهر Z فعالية أقل من BAP في تجديد الكالس من المعلقات الخلوية وتباينت المعلقات في استجابتها للتجديد بتأثير Z ، فقد كان استخدام التركيز 1.5 ملغ/ل من Z هو الأمثل لتشكل الكالس من معلقات الأوراق، والسلاميات للصنف أمارين، ومعلقات الأوراق للصنف تشالنجر.

إن تأثير مصدر الخزعة (الأوراق والسلاميات) في التباين الوراثي بين النباتات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية في الصنف أمارين كان متماثلاً وذلك سواءً عند استخدام BAP أو Z في وسط التجديد، بينما كان التباين الوراثي بين النباتات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية في الصنف تشالنجر متقارباً عند استخدام BAP في وسط التجديد، في حين كان تأثير الأوراق في التباين الوراثي المدروس أعلى مقارنة مع تأثير السلاميات عند استخدام Z في وسط التجديد. إن التباين الوراثي المدروس في كلا الصنفين (أمارين وتشالنجر) والنتائج عند استخدام BAP في وسط التجديد كان أعلى مقارنة مع التباين الوراثي الناتج عند استخدام Z.

الكلمات المفتاحية: بطاطا، تباين الوراثي، كالس، معلقات الخلوية ، 2,4-D ، BAP ، Z ، ISSR.



الفصل الأول: المقدمة

INTRODUCTION

1- المقدمة Introduction:

تعد البطاطا (*Solanum tuberosum* L.) من أهم محاصيل الخضار في العالم، تنتمي البطاطا *Solanum tuberosum* إلى الجنس *Solanum*، وتتبع الفصيلة الباذنجانية Solanaceae التي تضم نحو 90 جنساً و 2000 نوع تقريباً (بوراس وزملاؤه، 2006).

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).

تعد أمريكا الوسطى والجنوبية (تشيلي، البيرو والمكسيك) الموطن الأصلي للبطاطا، 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 وزملاؤه، 2006).

تعد البطاطا من أحد أهم المحاصيل الزراعية في العالم وغذاءً أساسياً في البلدان النامية، ويرجع ذلك لوفرة غلتها ورخص إنتاجها وتنوع الظروف البيئية التي تنمو فيها، وبالإضافة لكونها غذاء للإنسان فإنها تقدم أيضاً كعلف للحيوانات، ولها استعمالات عديدة في مجال الصناعة حيث يستخرج منها النشاء وتستخدم في صناعة الورق والمنسوجات وصناعة المواد اللاصقة بالإضافة إلى استخدامها في صناعة التخمر واستخراج الكحول مثل الإيثانول والبيوتانول وبعض الأحماض مثل الستريك و اللاكتيك. (بوراس، 1989).

يستأثر محصول البطاطا باهتمام عالمي كبير كونه أحد أكثر المحاصيل الغذائية غنى بالطاقة، فكما هو الرز بالنسبة لدول شرق آسيا والخبز لدول شرق البحر الأبيض المتوسط، فإن محصول البطاطا يعد الغذاء الرئيس بالنسبة لدول أوروبا والأمريكيتين وحتى دول أفريقيا، إذ يحتوي كل 100 غ من درنات

البطاطا المقشرة على 79.8 غ ماء، 0.1 غ دهون، 17.1 غ كربوهيدرات، 0.5 غ ألياف، 0.9 غ كالسيوم، 53 مغ فوسفور، 0.6 مغ حديد، 3 مغ صوديوم، 4.7 مغ مغنيزيوم، 0.1 مغ ثيامين، 0.4 مغ ريبوفلافين، 1.5 مغ نياسين، 20 مغ حامض الأسكوربيك (الموصللي، 2000).

تتميز البطاطا بأنها من المحاصيل واسعة الانتشار، فهي تنتشر في جميع دول العالم تقريباً، من المحيط المتجمد الشمالي حتى خط العرض 46 جنوباً، المتحدة (Young، 1990)، ونتيجة للتقدم التقني الكبير أصبح من الممكن زراعة البطاطا في مختلف أنحاء العالم ما عدا السهول الدافئة (Shekhawat و Naik، 1999)، وهذا بدوره أدى إلى زيادة ملحوظة في الإنتاج العالمي من البطاطا الدول الأكثر إنتاجاً للبطاطا عالمياً.

ويبين الجدول (1) الدول الأكثر إنتاجاً للبطاطا عالمياً. يعد محصول البطاطا من المحاصيل المهمة في جميع بلدان ساحل البحر الأبيض المتوسط ويحتل مساحة تبلغ حوالي مليون هكتار وتنتج 19 مليون طن من الدرنات (Frusciante وزملاؤه، 1999).

الجدول (1): الإنتاج العالمي من البطاطا خلال العام 2014

الدول الأكثر إنتاجاً للبطاطا خلال العام 2014	الإنتاج مقدراً بـ مليون طن
الصين	85.8
الهند	45
روسيا	29.5
أوكرانيا	23.3
أميركا	19.2
ألمانيا	10.6

(منظمة الأغذية والزراعة FAO، 2014)

1-1 واقع زراعة البطاطا في سورية:

أدخلت زراعة البطاطا إلى سورية منذ بداية الخمسينيات من القرن العشرين، وتطورت تطوراً سريعاً لتوفر الظروف المناسبة لها، حيث بدأ الاهتمام والتخطيط لزراعة هذا المحصول في سورية منذ بداية السبعينات وكانت الأصناف المزروعة عبارة عن صنفين فقط ثم بدأت الأبحاث الزراعية تهتم بمتطلبات البطاطا الزراعية من حيث المعاملات الزراعية اللازمة والظروف المناخية والاحتياجات الغذائية. ومع بداية الثمانينات بدأ إدخال الأصناف الجديدة إلى القطر وتنوعت الأصناف باختلاف البيئات في القطر وبدأت المساحات الزراعية تتسع وتزداد، وازداد الاهتمام من قبل وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي والفلاحين بزراعة هذا المحصول حتى أصبح من المحاصيل الغذائية المهمة (NAPC، 2008) إلا أن الإنتاجية كانت بطيئة ولا تتناسب مع معدل نمو السكان ويبين الجدول (2) تطور المساحات المزروعة وإنتاج البطاطا والغلة في سورية.

الجدول (2): مساحة وإنتاج وغلة البطاطا حسب المحافظات وتطورها على مستوى القطر خلال

الفترة (2005-2014)

العام	المساحة (هكتار)	الإنتاج (طن)	الغلة (كغ/هـ)
2005	29500	608400	20623
2006	27720	603400	21767
2007	31082	570128	18342
2008	36172	720492	19918
2009	34855	705586	20243
2010	34500	673200	19513
2011	35351	715276	20233
2012	34012	698129	20526
2013	22439	441718	19685
2014	29878	539611	18060

(المجموعة الإحصائية السنوية، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، 2014)

1-2 مواعيد وطريقة الزراعة:

تزرع البطاطا في سورية في عروات ثلاث:

1-2-1 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.

1-2-2 عروة صيفية: تزرع ابتداءً من منتصف آذار حتى منتصف نيسان، وهذا يلائم المناطق الباردة.

1-2-3 عروة خريفية: تزرع ابتداءً من منتصف تموز حتى منتصف آب، وهذا يلائم المناطق الداخلية

(بوراس وزملاؤه، 2006).

1-3 طريقة الزراعة الأكثر شيوعاً في سورية هي طريقة الزراعة النصف آليّة، وهناك الزراعة اليدوية و

بشكل قليل الزراعة الآليّة، وأهم أصناف البطاطا المزروعة في سورية هي: ليزيتا - بنيلا - دراجا -

مارفونا - بورين - سبونتا - أغريا - أطلس - أرنوبا - سولاني - أريندا. (FAO، 2014).

1-4 طرائق إكثار البطاطا:

1-4-1 الإكثار الجنسي (Sexual reproduction):

يستخدم للأغراض البحثية وأغراض التربية لإنتاج أصناف جديدة، أما تسويقياً فالدرينات الناتجة

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

1-4-2 الإكثار اللاجنسي (Asexual):

1-2-4-1 بالدرنات: وهي الطريقة الرئيسة المتبعة للإكثار وذلك بزراعة الدرنات الكاملة أو قطع منها،

والتي هي عبارة عن سوق متحورة لإختزان الغذاء، ومن ميزات 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 وزملاؤه، 1987).

1-4-2-2 زراعة النسيج النباتية: ويتم الإكثار بالنسج بطريقتين :

- إنتاج شتول بأعداد كبيرة بالنسج بعد تقسيثها في البيوت الزجاجية (Albiski وزملاؤه، 2001).

- إنتاج درينات دقيقة في المخبر باستخدام أوساط مغذية خاصة (المعري وزملاؤه، 2008).

1-5 مبررات البحث وأهدافه: Research justifications and objectives

إن عملية تعديل المادة الوراثية من خلال تقنيات زراعة الأنسجة ونقل الجينات تحمل إمكانيات

كبيرة لتحسين الصفات الإنتاجية النوعية والكمية لمحصول البطاطا (Jayaree وزملاؤه، 2001).

إضافةً لذلك شكلت التراكيب الوراثية القليلة الناتجة من التهجين على المدى الطويل للأنواع التابعة لجنس

البطاطا حواجز أمام مربي البطاطا للحصول على برنامج سريع لتلبية متطلبات السوق بإنتاج أصناف

جديدة.

ساعدت برامج التربية والتحسين الوراثي للبطاطا في تطوير بعض الأصناف الجديدة، التي تلبي

متطلبات السوق من حيث مقاومتها للإجهادات، 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. إن استخدام تقنية مزارع المعلقات الخلوية نظام مرغوب

به لاختيار الطفرات باتباع مخطط أسهل وأبسط من مزارع البروتوبلاست، ويمدى طفرات أوسع من طرائق

التربية التقليدية، من هنا تبرز أهمية التربية المعتمدة على التقنيات الحيوية وخصوصاً الطفرات المقاومة

للإجهادات الحيوية واللاحوية.

ومع ذلك فإنه من الصعب إلى حدٍ ما تثبيت الطفرات في نباتات البطاطا مقارنة مع غيرها من

المحاصيل، والذي يعزى جزئياً إلى تقنيات زرع المعلقات الخلوية، والمستويات الصبغية العالية التي عادةً

ما تترافق مع معدل تطفير منخفض (Qi وزملاؤه، 1996).

بالتالي من الضروري زيادة تحسين تقنيات مزارع الخلايا النباتية لمحصول البطاطا وتحديد الطفرات على مستوى الخلايا المفردة، لذلك قبل البدء ببرامج التحسين الوراثي المعتمدة على المعلقات الخلوية لابد من تحديد المصدر الأنسب لتحضير المعلق الخلوي كمرحلة أولى، ومن ثم شروط زرعها كمرحلة ثانية، ليصار إلى استخدامها في عمليات التحسين أو الإنتاج المرغوبة.

لذا هدف هذا البحث إلى:

- 1- أمثلة الأوساط المغذية المستخدمة في الحصول على المعلقات الخلوية وتحديد التركيز الأمثل من هرمون 2,4-D اللازم لاستحداث الكالس وعزل الخلايا وتجديدها من الأوراق والسلاميات من صنف البطاطا تشالنجر (Challenger) و أمارين (Amarin).
- 2- تحديد حيوية خلايا المعلقات الخلوية باستخدام تقنية اختبار TTC.
- 3- تحديد التباين الوراثي على مستوى الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية ومقارنتها مع آبائها باستخدام تقنية التكرارات التتابعية البسيطة الداخلية (ISSR) Inter Simple Sequence Repeats.

الفصل الثاني: الدراسة المرجعية
LITERATURE REVIEW

2- الدراسة المرجعية LITERATURE REVIEWS:

تعد تقانة زراعة الأنسجة النباتية من التقانات المهمة في عمليات التحسين الوراثي Genetic improvement، إذ فتحت آفاقاً واسعة في التطبيقات الزراعية، وتطورت استعمالاتها خلال الفترة الماضية تطوراً بشكل كبير حيث شملت عدداً كبيراً من النباتات، كما توسعت فوائدها التطبيقية في استنباط طرز وراثية من البطاطا أكثر تحملاً للإجهادات البيئية. ومن هنا برزت أهمية هذه التقانة كطريقة بديلة للطرائق التقليدية في الإكثار و برامج التربية والتحسين الوراثي للنباتات ، كما أنها من الوسائل التطبيقية المهمة في دراسة العمليات الفسيولوجية، وتوفر عدداً من المزايا التي لم تكن متاحة من قبل في الطرائق التقليدية ولعل أهمها إجراء انتخاب النباتات على المستوى الخلوي، وفصل الخلايا المرغوبة وفحصها خلال فترة زمنية قصيرة ومساحة محدودة، ويجري تقييم كامل للنباتات الناتجة من هذه الخلايا في مراحل مختلفة من النمو والتمايز، كما يمكن دراسة المقدرة على توريث الصفة ودرجة ثباتها من خلال فحص ودراسة النسل الناتج من هذه النباتات (زكي، 2000).

يطلق مصطلح زراعة الخلايا cell culture على عزل وزرع الخلايا النباتية المفردة في وسط مغذٍ سائل على شكل معلق خلوي حيث تقوم الخلايا خلاله بالتمثيل الغذائي وبالإقسام الخلوي والنمو (King، 1980).

تنمو مزارع المعلقات الخلوية، بشكل عام، في الأوساط المغذية السائلة بسرعة أكبر من مزارع الكالس النامية على أوساط مغذية صلبة وتكون أكثر قابلية لتنفيذ الأبحاث بطرائق عديدة (Evans وزملاؤه، 2003). ويستخدم المعلق الخلوي كنظام نموذجي لدراسة العوامل المختلفة التي تؤثر في الاستجابات المتباينة كنمو و تمايز الخلايا تحت الإجهادات الحيوية أو اللاحيوية. حيث يفضل نظام

المعلقات الخلوية على النسيج النباتي الكامل أو النباتات الكاملة لدراسة استقلاب الخلية وآلية التكيف مع الإجهاد على المدى الطويل أو القصير (Leone وزملاؤه، 1994؛ Phillips و Fallon، 1989).

تعد المعلقات الخلوية أداة مهمة في دراسة بيولوجيا النبات بما في ذلك بيولوجيا الخلايا والاستقلاب الخلوي ودراسة توريث الصفات المظهرية، كذلك الأمر استخدمت مزارع الخلايا النباتية في دراسة التأثير بين النباتات والأحياء الدقيقة (Thrope وزملاؤه، 2006).

إن زراعة المعلقات الخلوية بدءاً من الخلايا المفردة (ومجموعات خلوية صغيرة) قد تحققت عن طريق مزارع الكالس من نباتي التبغ *Nicotiana.sp* و الديجتالس *Digitis.sp* ، ومن ثم إعادة تجديدها لتكوين الكالس (Muir وزملاؤه، 1954 ؛ Muir وزملاؤه، 1958)، وفي عام 1953 تم تحقيق نجاح كبير في زراعة الخلايا النباتية المفردة بدءاً من خلايا متميزة ناضجة معزولة بالطريقة الميكانيكية من ميزوفيل الورقة لنبات *Macleaya.corlata* (Kohlenbach، 1959).

تعد مزارع المعلقات الخلوية أكثر قابلية لدراسات الكيمياء الحيوية وعملية التحسين الوراثي مقارنة مع مزارع الكالس، لأنها تنمو عادةً بمعدل أسرع وتسمح للخلايا النباتية أن تكون على اتصال مباشر مع المواد الغذائية الموجودة في الوسط المغذي (Fowler، 1987؛ Su، 1995).

تميل المعلقات الخلوية إلى احتواء كتل خلوية مؤلفة من عدد متغاير من الخلايا، تنشأ هذه الكتل نتيجة فشل الخلايا الجديدة في الانفصال بعد حدوث الانقسام الخلوي أو من تماسك الخلايا الحرة فيما بينها، في بعض الحالات قد تحتوي هذه الكتل (التي تسمى بالمجاميع الخلوية أيضاً) على ما يقرب من 200 خلية، ويصل قطرها إلى 2 مم، في حين يمكن التغلب على التصاق هذه الخلايا عن طرق تغيير الوسط المغذي (Fowler، 1982).

إن تشكيل معلق خلوي جيد يتكون من نسبة عالية من الخلايا المفردة ، ومجموعات صغيرة من الخلايا هو أكثر تعقيداً من العثور على الظروف المثلى لفصل الخلايا (King، 1980).

تكون حركية النمو للخلايا ضمن المعلق الخلوي عادةً في منحني لوغاريتمي (Tang وزملاؤه، 2001)، فعندما توضع الخلايا النباتية في الوسط لا يحدث أي انقسام بادئ الأمر، يعقب ذلك تزايد سريع في معدل انقسام الخلايا وزيادة خطية في تعدادها، ثم تباطؤ تدريجي في معدل الانقسام، وأخيراً تدخل الخلايا مرحلة الثبات أو عدم الانقسام (Street، 1977). تبدأ زراعة المعلقات الخلوية عموماً عن طريق نقل أجزاء من الكالس غير المتمايز الذي يتم تحريكه خلال فترة الزرع (King، 1980). على الرغم من أن زراعة المعلقات الخلوية قد تأخذ وقتاً أطول إلا أنها يمكن أن تبدأ من زراعة خزعات نباتية متباينة (على سبيل المثال : أوراق فلقية، أو تحت فلقية) والخلايا المنقسمة سوف تتحرر بشكل تدريجي من المصدر النباتي الملقح (الكالس، أو خزعات نباتية مختلفة) نتيجة لتحريك الوسط المغذي السائل وقد يتم أيضاً تحرير الخلايا النباتية من الأجزاء النباتية المختلفة بطرائق فيزيائية (ميكانيكية) أو إنزيمية (Butcher و Ingram ، 1976).

يعد اختيار المادة النباتية الأم المناسبة ومصدر الخزعات النباتية واختيار وسط الزرع وظروف الزرع من الشروط الأساسية لنجاح تشكيل مزارع الكالس (Evans وزملاؤه، 2003). تم استخدام مصادر مختلفة للخزعات في أبحاث مختلفة من أجل الحصول على الكالس لنبات البطاطا (Ahloowalia، 1982 ؛ Alwareh وزملاؤه، 1989؛ Yasmin وزملاؤه 2003؛ المعري وزملاؤه، 2016) من ضمنها (العقد، السلاميات، الأوراق، والدرنات) وأوساط زرع مختلفة من أجل استحداث الكالس وإكثاره، كما أن تشكيل الكالس لا يعتمد فقط على الأنواع النباتية ولكن أيضاً على مصدر الخزعة والوسط الغذائي والضوء ودرجة الحرارة وعمر الخزعة (Shirin وزملاؤه، 2007)، على سبيل المثال درس John و Qureshi (1985) استحداث الكالس من عدد من أصناف البطاطا واقترحا أن السلاميات أفضل مصدر للخزعات. كما استخدمت السلاميات أيضاً في العديد من الأبحاث الأخرى

كمصدر لاستحداث الكالس في البطاطا (Zel وزملاؤه، 1999 ؛ Vargas وزملاؤه، 2005؛ Shirin وزملاؤه، 2007).

أظهرت الدراسات أن استحداث الكالس في البطاطا يتطلب وجود تراكيز مناسبة وبكميات مختلفة من منظمات النمو النباتية في الوسط المغذي MS (Shepard و Totten، 1977 ؛ Kuldybear وزملاؤه، 1995 ؛ Jayaree وزملاؤه، 2001). كما بين Yasmin وزملاؤه (2003) في دراسة أجريت للصنف Nevskii باستخدام خمسة تراكيز (0-1.25-2.5-5-10) مغ/ل من الأوكسين NAA، و (0-0.5-1-2-4) مغ/ل من السيتوكينين BAP إلى الوسط المغذي MS. حيث تم الحصول على أعلى نسبة من الكالس المستحدث بقيمة بلغت (95%) باستخدام التركيز 2.0 مغ/ل BAP + 2.5 مغ/ل NAA وبأقل وقت ممكن لتحريض الكالس.

كما درس Abd-Elaleem وزملاؤه (2009) تأثير منظمات النمو النباتية على استحداث الكالس في صنف البطاطا Diamant، إذ استخدموا الوسط المغذي MS مضافاً له تراكيز مختلفة من الأوكسينات NAA ، 2,4-D ، السيتوكينينات BAP و TDZ لوحدها ومزيج من الأوكسين 2,4-D مع السيتوكينين BAP ، حيث تم الحصول على أفضل كالس جيد التكوين في الوسط MS مضافاً له 3.0 مغ/ل من الأوكسين 2,4-D، وكذلك حصل Khalafalla وزملاؤه (2010) على أعلى نسبة من الكالس المستحدث بلغت 100% باستخدام الوسط MS مضافاً له 2 مغ/ل من الأوكسين 2,4-D ، كما حصل Laboney وزملاؤه (2013) على الكالس من صنف البطاطا Granula بدءاً من البراعم على الوسط MS مضافاً له 2 مغ/ل من الأوكسين 2,4-D وبنسبة استحداث 95% وخلال 10 أيام والوزن الرطب 0.074 غ، كما نجح Kumar وزملاؤه (2014) في استحداث الكالس لصنفين من البطاطا Kufri Chipsona و MP_97/644 بدءاً من خزعات ورقية في الوسط MS مضافاً له (1 مغ/ل Kin + 3 مغ/ل 2,4-D)، كما قام Kumlay و Ercisli (2015) بدراسة تراكيز مختلفة ومجموعات مختلفة

من منظمات النمو النباتية والخزعات النباتية (العقد، الأوراق)، حيث بلغ أعلى نسبة لاستحداث الكالس 87.5% وأكبر قطر 1.9 سم وأعلى وزن رطب 2.04 غ على الوسط MS مضافاً له 3 مغ/ل BAP + 2 مغ/ل NAA حيث كانت استجابة العقد أفضل من الأوراق، كما أظهرت نتائج الدراسة التي قام بها AL-Hussaini وزملاؤه (2015) لاستحداث الكالس لأربعة أصناف من البطاطا وباستخدام مزائج هرمونية مختلفة أن أعلى نسبة للاستحداث الكالس والوزن الرطب وأقل عدد أيام للتشكل كانت عند استخدام الوسط MS + 2 مغ/ل 2,4-D و الوسط MS + 2 مغ/ل 2,4-D + 2 مغ/ل BA.

مما سبق يتضح إمكانية الحصول على الكالس من نباتات البطاطا مع اختلاف مصدر الخزعة النباتية والمزائج الهرمونية المناسبة في الأوساط المغذية وباختلاف الأصناف المدروسة.

أشار Zhang و Wang (2002) إلى مصدر الخزعة النباتية المناسب للبدء في زراعة المعلق الخلوي حيث اقترحوا أن الأوراق الفلقية والأوراق تحت الفلقية و السلاميات كانت مصادر استزراع ممتازة للحصول على كالس متفتت جيد النمو إذ تم الحصول منها على مزارع معلقة ذات خلايا قوية.

كما درس Dai و Zhang (2000) تأثير حالة الكالس وفترة إعادة الزرع بدءاً من الكالس وأوساط النمو المختلفة على نوعية مزارع المعلق الخلوية من صنف البطاطا Gan- nongshu No. 2 و Russet Burbank، حيث بيّنوا أن أفضل معلق خلوي يمكن الحصول عليه بدءاً من الكالس بعد تكرار زراعته 1-3 مرات، وإلى ضرورة تكرار الزرع كل 5 أيام وتجديد الوسط بإضافة ¼ من الوسط المغذي الجديد إلى ¼ الوسط المغذي القديم.

وقد درست زراعة المعلق الخلوية في العديد من الأبحاث السابقة حيث كانت تتم بهدف الحصول على الأجنة الخضرية في طرز وراثية متباينة للبطاطا بتقسيم مزارع الكالس الناتجة عن الأنسجة النباتية المختلفة (Sopory وزملاؤه، 1978 ؛ Petrova و Dedicova، 1992 ؛ De Garcia و Martinez، 1995 ؛ Seabrook و Douglass، 2001 ؛ Seabrook وزملاؤه، 2001؛

Jayaree وزملاؤه، 2001؛ Vargas وزملاؤه، 2005)، يمكن تأسيس مزارع المعلقات الخلوية بسهولة عند زراعة كالس البطاطا المتفتت في بيئة غذائية سائلة مضافاً لها 2,4-D، كما أن وجود تراكيز منخفضة جداً من الساييتوكينينات يمكن أن يكون مفيداً في مزارع المعلقات الخلوية (Bajaj و Dionne، 1967 ؛ Lam، 1977).

ومهما كانت الخزعات النباتية المختارة ، ففي جميع الحالات ، فإن الكالس الذي يتم اختياره للحصول على مزارع المعلق الخلوي يجب أن يكون سليم ومتفتت وقوي النمو (Evans وزملاؤه، 2003؛ Vargas وزملاؤه، 2005).

كذلك الأمر قام Muhlbach (1983) بتحضير معلق خلوي من النوع البري للبطاطا *S. demissum* بدءاً من كالس متفتت حديث التطور. في حين تمكن Torabi وزملاؤه (2008) من الحصول على معلق خلوي من صنف البطاطا Desiree أيضاً بدءاً من نسيج الكالس المتفتت. ونجح Sajid (2010) أيضاً من تكوين معلق خلوي لصنفين من البطاطا Desiree و Cardinal بدءاً من كالس متفتت شفاف أبيض اللون بعمر 8 أسابيع حيث استخدمت السلاميات مصدراً لاستحداث الكالس. بالإضافة إلى ذلك اعتبر Vargas وزملاؤه (2005) أن هناك خطوة مهمة عند تأسيس وتكوين معلقات الخلايا النباتية ألا وهي الكمية المناسبة من كتلة الكالس المضافة إلى وسط النمو السائل وفترة إعادة الزرع حيث أشار إلى أن هذه النسبة كانت 1 غ من نسيج كالس البطاطا *S. tuberosum* في 100 مل من الوسط السائل ومن خلال الترشيح المتكرر وإعادة الزرع تم تخفيف المزارع المعلقة بحيث تحتوي على مجاميع خلوية صغيرة وخلايا حرة مفردة عائمة.

اقترح Sajid (2010) أن تكون الكمية المضافة من الكالس لكلا الصنفين Desiree و Cardinal 0.5 غ لكل 25 مل من الوسط المغذي السائل في دورق سعته 100 مل، حيث يتكرر الزرع كل 3 أيام.

قام Anjum (1994) بإضافة 2 غ من كالس صنفى Desiree و Maris piper إلى 50 مل من الوسط السائل في دورق حجمي سعته 250 مل وكرر الزرع كل 10 أيام.

أشار Street (1977) إلى أنه من أجل الحفاظ على استمرارية حيوية المعلق الخلوي ينبغي إعادة زرع الخلايا في وقت مبكر من مرحلة الثبات، عند الوصول إلى الحد الأقصى للكثافة الخلوية، حيث يتم الوصول إلى الحد الأقصى من الكثافة الخلوية بالنسبة للعديد من المعلقات الخلوية ضمن حوالي 18-25 يوم ، على الرغم من وصول بعض المعلقات الخلوية النشطة إليه ضمن 6-9 أيام.

وقد بين Anstisand و Northcote (1973) أن مرحلة السكون لخلايا المعلق الخلوي للصنف King Edward استمرت ليومين بعدها دخلت الخلايا مرحلة الانقسام المتزايد وبعد 19 يوم دخلت الخلايا مرحلة الثبات، وقد توصل Chung و Sim (1986) لنتيجة مماثلة للصنف Dejima.

يتم فترة المزرعة الخلوية من خلال فلتر من النايلون أو شبكة معدنية لإزالة الركام الخلوي الكبير، وقد اقترح Torabi وزملاؤه (2008) فترة 10-11 يوم لتكرار الزرع للمعلق الخلوي لصنف البطاطا Desiree، أما Sajid (2010) فقد أشار إلى ضرورة تكرار الزرع كل 3 أيام للمعلق الخلوي لكل من الصنفين Desiree و Cardinal.

في دراسة تمت على نبات البطاطا الحلوة (*Ipomoea batatas* L.(LAM)) اقترح Liu وزملاؤه (1980) أن يتكرر الزرع كل أسبوعين للبدء بكثافة خلوية 2×10^4 خلية في كل 1 مل من المعلق الخلوي. أما Gurel وزملاؤه (2002) أشاروا إلى ضرورة تكرار الزرع كل أسبوع بنقل 30 مل من أصل 50 مل إلى الوسط المغذي السائل الجديد ، حيث تم البدء بزراعة المعلق الخلوي الخاص بنبات الشوندر السكري *Beta vulgaris* L. بتلقيح 1 غ من الكالس إلى دورق سعته 250 مل يحوي 50 مل من الوسط المغذي السائل.

كما تشير الأبحاث ذات الصلة أنه للحصول على معلق خلوي جيد النمو من الضروري ألا يقل تركيز الخلايا عن 10^4 خلية لكل 1 مل من المعلق، مالم تكن الخلايا غير منقسمة ، كما يعتمد أيضاً على حجم الكتل الخلوية المتشكلة، إذ يدل حجمها على تشكل طبيعي للخلايا (Street، 1977).

يجب تحريك المعلقات الخلوية أو تعريضها لعملية تهوية، ويستخدم لهذا الغرض جهاز هزاز رحوي في معظم المختبرات، وقد أشار Muhlbach (1983) أن أفضل سرعة للحصول على مزارع خلوية باستخدام دوارق حجمية سعة 250 مل هي 100-120 دورة / دقيقة، كذلك أشار Sajid (2010) أن أفضل سرعة للحصول على معلق خلوي جيد للببائط هي 120 دورة / دقيقة ، في حين أوضح Schafer-Menuhr وزملاؤه (2003) أن سرعة الدوران الأمثل كانت 150 دورة / دقيقة لمعلق خلوي لصنف الببائط Clarissa، وقد اقترح Anjum (1994) 110 دورة /دقيقة كأفضل سرعة.

كما إن حجم السائل بالنسبة للدورق مهم للحصول على تهوية كاملة حيث يجب أن يشكل حوالي 20% من الحجم الكلي للدورق، وهناك أجهزة تحريك أخرى لتأمين التهوية مثل المحرك المغناطيسي، والمزرعة الاسطوانية (King، 1980).

إن التقييم الدقيق لعدد الخلايا القابلة للحياة في عدد الخلايا الإجمالي مهم جداً لمنع إدراج الخلايا ذات الحيوية المنخفضة أو الميتة ضمن نتائج الخلايا الحية أو الوزن الطازج أو للإشارة إلى أقصى كثافة خلوية ممكنة يمكن بلوغها (Castro-Concha وزملاؤه، 2006)، وتعد الخلية قابلة للحياة إذا كانت لديها القدرة على النمو والتطور (التمايز) (Palta وزملاؤه، 1978؛ Pegg، 1989)، وتستند طرق قياس الحيوية على الخصائص الفيزيائية للخلايا كسلامة الغشاء الخلوي، أو على النشاط الاستقلابي كالحد من أملاح التترازوليوم Tetrazolium أو تحليل ركائز مفلورة (Castro-Concha وزملاؤه، 2006).

لتقييم سلامة الغشاء الخلوي استخدمت الأصباغ مثل أزرق إيفان (Smith وزملاؤه، 1982 ؛ Baker وزملاؤه، 1994)، أزرق الميثيلين (Huang، 1986) أزرق تروبان (Hou و Lin ، 1996) الأحمر المعتدل (Perrier و Crippen، 1974) وفينوسيفرانين (Wildholm، 1972)، حيث تنتشر هذه المركبات من خلال تمزق الأغشية وتصبغ محتويات الخلايا الميتة وبعد ذلك يتم العد عن طريق الشرائح المجهرية أو التقدير بجهاز المطياف الضوئي. استخدمت صبغة أزرق إيفان في تقييم حيوية خلايا العديد من الأنواع النباتية مثل البصل والفاصولياء (Taylor و West، 1980) والقهوة العربية (Da silva و Yuffa، 2006) والبطاطا (ALqabani، 2012).

استخدمت صبغة فينوسيفرانين في تقييم حيوية المعلق الخلوي في فول الصويا حيث تظهر الخلايا الحية باللون الأحمر (Da silva و Yuffa ، 2006) وهناك أساليب أخرى تعتمد على قياس نشاط الإنزيمات كإنزيمات الإرجاع والاستيراز.

في حالة إنزيمات الاستيراز ضمن الخلايا تحلل الركائز المفلورة (فلورسين ثنائي أسيتات FDA) والتي يمكن أن تمر عبر الغشاء الخلوي وعندها تلتصق بمجموعة ثنائي الاسترات منتجة فلورسين عالي الفلورة، والذي سوف يتراكم في سيتوبلازم الخلايا ذات الأغشية السليمة ، وبالتالي فإن أخضر الفلورسين يمكن أن يستخدم كمؤشر على حيوية الخلايا (Steward، 1999) أو بطريقة بديلة لقياس نشاط الاستيراز عبر استخدام تحليل طيفي ثنائي الأبعاد للفلورسين، الأمر الذي يوفر في عملية عد الخلايا الحية والميتة بالمجهر والتي تستغرق وقتاً طويلاً وغالباً ما تكون صعبة (Vanková، 2001). استخدمت صبغة FDA في تقييم حيوية البروتوبلاست في صنف البطاطا Delaware و May queen (Kikuta وزملاؤه، 1984؛ Ehsanpour و Jones، 2001) وفي تقييم حيوية حبوب اللقاح في الرز (Khatun و Flowers ، 1995).

أما في حالة إنزيمات الإرجاع فإن الأصبغة مثل TTC (2,3,5- triphenyltetrazolium

chloride) و MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide) تعد كمستقبلات الكترونية في سلسلة نقل الإلكترون من الميتوكوندريا، والتي تعتمد على

نشاط إنزيم Succinate dehydrogenase، ونتيجة لذلك يتم تحويل هذه الصبغات التي لا لون لها

إلى مادة الفورمازان Formazan ذات اللون الأحمر غير القابلة للذوبان داخل الخلايا الحية ذات

الميتوكوندريا كاملة النشاط (Mazur و Towill، 1975) ثم يتم أخذ القراءة على جهاز المطياف

الضوئي Spectrophotometer على طول موجة 485 نانومتر. استخدمت صبغة TTC بنجاح في

تقييم حيوية الخلايا لنبات *Ulva.fasciata* لدراسة تأثير المستويات الملحية المختلفة في نمو الخلايا

وحيويتها (Chug chang وزملاؤه، 1999)، كما استخدمت لتقييم حيوية خلايا الكالس لنبات

Gentianapem عند تعريضها للحرارة المنخفضة (Mikuta وزملاؤه، 2009).

تعد الأوساط المغذية المناسبة لزراعة الكالس، بشكل عام ، مناسبة أيضاً لزراعة المعلقات الخلوية

مع عدم الحاجة لوجود المادة المهلمة (Tang وزملاؤه، 2001). ولكي تتم زيادة معدل نمو الخلايا

ضمن المعلق الخلوي اقترح (Gerard وزملاؤه، 1991) ضرورة وجود نسبة عالية من النترات/

الأمونيوم في الوسط المغذي MS مع إضافة 2,4-D و NAA.

استخدم Lindeque وزملاؤه (1991) الوسط MS مضافاً له المزيج الهرموني من الأوكسينات

والسيتوكينين (2 مغ/ل 2,4-D، 2 مغ/ل NAA، 2 مغ/ل KIN) مع خلاصة الخميرة لاستحداث الكالس

من صنف البطاطا BP1 ، في حين استخدم Torabi وزملاؤه (2008) المزيج الهرموني ذاته لتكوين

معلق خلوي للصنف Desiree.

إن تجديد النباتات غالباً ما يكون الخطوة الأكثر أهمية في نجاح التقنيات الحيوية المختلفة في أي

برنامج تحسين وراثي نباتي، و تجديد مزارع الكالس في البطاطا يعتمد بشكل كبير على الطرز الوراثية،

مصدر الخزعات النباتية ومنظمات النمو المستخدمة في الوسط المغذي وظروف الزرع، وقد استخدم Lam (1977) الوسط المغذي MS بدون نترات وخفض تركيز العناصر الصغرى إلى 1/5، في حين استخدم Anjum (1994) وسط مماثل لكنه خفض تركيز العناصر الصغرى إلى 1/2، أما Vargas (2005) و Sajid (2010) فقد استخدم الوسط MS متوسط القوة مضافاً له 3 مغ/ل 2,4-D.

إن كفاءة تجديد النبات من مجموعة من الأنسجة المستزرعة (ورقة، ساق، درنات) ولعدة طرز وراثية للبطاطا تم ذكرها والتطرق إليها في العديد من الدراسات (Ahloowalia، 1982، Hulme وزملاؤه، 1992).

ذكر Zel وزملاؤه (1999) أن عملية تجديد الصنفين Igor و Desiree كانت أكثر نجاحاً على الكالس المستحدث من السلاميات والمزروع في وسط MS مضافاً له (GA3، NAA، Z)، في حين كان الكالس المستحدث من الورقة والعقد مندمجاً وغير متشابه وراثياً مع استجابة قليلة للتجدد.

إن عملية التجديد تختلف باختلاف الأوساط المغذية المستخدمة، حيث لاحظ Yasmin وزملاؤه (2003) أن أعلى نسبة التجديد (80%) في الكالس المستمد من المعلق الخلوي لصنف البطاطا BP1 كانت باستخدام المزيج الهرموني (2.0 مغ/ل BAP + 2.5 مغ/ل NAA).

اختبر Abd-Elaleem وزملاؤه (2009) السيتوكينين TDZ (تدييزرون) وحده أو بالاشتراك مع منظمات نمو مختلفة لتجديد صنف البطاطا Diamant إذ تم الحصول على أعلى نسبة تجديد 81% وكان عدد النموات لكل كالس (3.4).

في دراسة أخرى أجراها Torabi وزملاؤه (2008) لتجديد النباتات من مزرعة المعلق الخلوي لصنف البطاطا Desiree تبين أن أكثر من 80% من مزارع الكالس أنتجت براعم خضرية باستخدام وسط MS مضافاً له (2.5 مغ/ل BAP و 5 مغ/ل GA3)، في حين أدى استخدام وسط MS المضاف

له مزيج مختلف من (NAA، IBA، BAP) وبتراكيز مختلفة إلى استحداث كالس بلون أخضر ولكن لم يتم الحصول على نموات خضرية على الرغم من وجود الأوكسين والسيتوكينين.

تعد المؤشرات الجزيئية Molecular markers ذات أهمية قصوى على صعيد تربية النبات، بفعل عدة عوامل منها: إمكانية تحديد موقع وراثي مطلوب لطرار 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 بزمان 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 وزملاؤه، 1996). وقد استخدمت تقنيات المؤشرات الجزيئية بنجاح في تقدير درجة التشابه الوراثي بين وضمن عدد كبير من الأنواع والأصناف النباتية مثل الرز (Joshi وزملاؤه، 2000)، القمح (Kondo و Kanbar، 2011)، والبطاطا (Sun و Huang، 2000).

تعتمد تقنيات المؤشرات الجزيئية على التفاعل التسلسلي البوليمرازي Polymerase Chain Reaction (PCR)، حيث يتم تضخيم قطعة محددة من الحمض النووي DNA باستخدام مرئسات محددة (Weising وزملاؤه، 1995)، ويتم تفاعل PCR بوجود مركبات أساسية هي كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$ ، والنكليوتيدات ثلاثية الفوسفات (dNTPs) DeoxynucleotideTriphosphates، وأنزيم Taq-Polymerase. و يتم تضخيم الحمض النووي DNA عبر عدد من الدورات يصل لـ 40 دورة

(Newton وGraham، 1994) في جهاز الدور الحراري ، وقد طُور التفاعل التسلسلي البوليمرازي 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 الحمض النووي منقوص الأوكسجين DNA باستخدام مرئسات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الدنا التي تتضاعف أسياً، وذلك باستخدام دورات حرارية متعددة (Ayad وزملاؤه، 1997) ، ويمر التفاعل التسلسلي البوليمرازي PCR في ثلاث خطوات رئيسية يتم خلالها تصنيع سلاسل جديدة من الحمض النووي DNA ابتداءً من قطعة أولية:

مرحلة التحطم الحراري (Denaturation)، مرحلة الالتحام (Annealing) و مرحلة الاستطالة (Extention) (Mullis وزملاؤه، 1986) . ولقد أدى تطور التقنيات الحيوية إلى ظهور عدد كبير من المؤشرات الجزيئية المهمة التي تسمح بتوصيف الكائنات الحية ، والتميز حتى بين الوحدات التصنيفية الصغيرة، ومن أكثر التقنيات المستخدمة حالياً في دراسة التباين الوراثي في النبات:

- تقنية التضخيم العشوائي للتعدد الشكلي للدنا Randomly Amplified Polymorphic DNA (Williams وزملاؤه، 1990) (RAPD). تمتاز تقنية RAPD بإمكانية أتمنتتها وسهولة معرفة التسلسل النكليوتيدي للبادئ، وتتسم بالبساطة والسرعة وعدم الحاجة لكميات كبيرة من المادة الوراثية DNA، في حين يؤخذ عليها عدم ثباتية النتائج عند تكرارها لتأثرها بعوامل عديدة ، الأمر الذي جعلها لا تتمتع بثقة الباحثين (Virk وزملاؤه، 2000) .

- تقنية تباين أطوال قطع الدنا المضخمة Amplified Fragment Length Polymorphism (Zabeau وVos، 1993) (AFLP) . وتمتاز تقنية AFLP بأنها تسمح بإظهار عدد كبير من التعددات الشكلية، حيث تستعمل في تحديد البصمة الوراثية دون معرفة مسبقة بالتسلسل النيوكليتيدي للمرئسات المنتخبة مخبرياً لأي من المورثات سواء كان بسيطاً أو معقداً (Vos

وزملاؤه، 1995). لكن يؤخذ عليها أنها تتطلب خبرة عملية دقيقة وتحتاج إلى زمن طويل لإجرائها، كما أن تكلفتها مرتفعة (Karp وزملاؤه، 1997).

- تقنية التكرارات المتتابعة البسيطة Simple Sequence Repeat or Microsatellites (SSR) (Tautz، 1989). تعد تقنية SSR مثالية ومهمة 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 أتمتها، إلا أنه يعاب عليها حاجتها إلى مرئسات ذات تسلسل نيوكليوتيدي محدد يحدد مكان التابع البسيط الترادفي SSR في الجينوم (Sweigart وزملاؤه، 1999؛ Karp وزملاؤه، 1997).

- تقنية التكرارات المتتابعة البسيطة الداخلية (ISSR) Inter Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994) 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 للحمض النووي DNA. و تستخدم هذه التقنية كمؤشر جزيئي في دراسات البنية الوراثية والتنوع الوراثي (Fu- Rong وزملاؤه، 2007).

تعتمد تقنية ISSR على تضخيم المواقع بين التتابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكل متعاكس (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994)، وذلك باستخدام مرئسات وحيدة طولها (16-18 bp)، مؤلفة من نكليوتيدات متكررة (Bornet وزملاؤه، 2002؛ Nagaraju وزملاؤه، 2002).

إن الفائدة الرئيسة 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 وزملاؤه، 2001؛ Korbin وزملاؤه، 2002)، و إن بساطة مؤشرات ISSR تزيد من إمكانية استخدامها في الوسم الجينومي (Ammiraju وزملاؤه، 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 و Smith، 2000 ؛ Guiet وزملاؤه، 2008).

وقد بين Taylor وزملاؤه (2001) أن البصمة الوراثية لـ 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 وزملاؤه، 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 وزملاؤه، 2002). وقد استخدمت هذه التقنية كوسيلة جيدة للتوصيف الوراثي في البطاطا وفي برامج إدارة المادة الوراثية (Powell وزملاؤه، 1996) . واستخدمت تقنية ISSR في تقييم الهجن الجسمية الناتجة عن دمج بروتوبلاست الأصناف التجارية : Cardinal و Nicola و Aminca (Ellouza وزملاؤه، 2006). وقد درس (Kondo و Kanbar، 2011) التباين الوراثي بين 20 صنف مزروع من الشعير جمعت من سورية واليابان مستخدمين 23 بادئ من ISSR و 6 بوادئ 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. كما بين (Abouzied، 2011) فعالية تقنية ISSR في كشف التباينات الوراثية في القمح بين النبات الأم والنباتات الناتجة عن الكالس تحت عامل الإجهاد، كما استخدمت مؤشرات ISSR في الدراسات الوراثية للعديد من الأنواع النباتية لأنها فعالة في كشف المستويات المنخفضة جداً من التباينات الوراثية (Klliker وزملاؤه، 2003)، وطبقت بنجاح في دراسات التنوع الوراثي في عدد كبير من النباتات (Bornet وزملاؤه، 2002)، حيث استعملت تقانة الـ ISSR في تقييم التباين الوراثي بين 33 صنف محلي من أصناف البندورة اليونانية وثلاثة هجن من البندورة الكرزية (Terzopoulos و Bebeli)

(2008، كذلك استعملت في تقييم التباين الوراثي بين 96 طراز وراثي من البندورة في البرازيل (Aguilera وزملاؤه، 2011). وتم أيضاً استخدام مرئسات ISSR لتقييم التنوع الوراثي بين 8 أنواع من البندورة البرية في المكسيك (Vargas-Ponce وزملاؤه، 2011)، وفي دراسة التنوع الوراثي وعلاقات النشوء والتطور لـ 54 سلالة برية وصنف من البندورة لتسعة أنواع برية (Kochieva وزملاؤه، 2002).

الفصل الثالث: مواد البحث وطرائقه
MATERIALS AND METHODS

3- مواد البحث وطرائقه Material and Methods:

3-1 مدة ومكان تنفيذ البحث Duration and Site of Research:

نفذ البحث في مخابر كلية الزراعة- بجامعة دمشق، ومخبر التقانات الحيوية النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية - وزارة التعليم العالي خلال الفترة 2015- 2016.

3-2 المادة النباتية Plant Material:

استخدم في تنفيذ هذا البحث صنفان من البطاطا هما (تشالنجر - أمارين)، ويعد هذان الصنفان من أهم الأصناف التجارية رباعية الصيغة الصبغية المرغوبة والمعتمدة واللذان أجريت عليهما الدراسة لأول مرة في سورية.

3-2-1 الصنف تشالنجر Challenger Variety:

تتصف نباتات هذا الصنف بكونها ذات مجموع خضري طويل إلى متوسط الطول، نصف قائم إلى قائم ، الأوراق خضراء إلى خضراء داكنة ، ذو إزهار عالي إلى عالي جداً، النضج متوسط إلى متأخر التذكير ، طور السكون طويل، الدرناات بيضوية إلى بيضوية متطاوله، ذات قشرة صفراء متوسطة النعومة، وذات لب مائل للأصفر، عالية المحتوى من المادة الجافة ، العيون سطحية التوضع، الصنف ذو انتاجية عالية. الصنف متوسط التحمل لإصابة بفيروس YN، الشكل رقم (1).



الشكل رقم (1) : درناات الصنف *Solanum. Tuberosum .L.C.V. Challenger*

3-2-2 الصنف أمارين *Amarin Variety*:

النضج مبكر إلى متوسط التبكير ، طور السكون طويل إلى حد ما ، المجموع الخضري جيد النمو، الدرنات بيضاوية إلى مستديرة، لون القشرة أصفر، اللب كريمي، العيون سطحية نوعا ما ، حجم الدرنات كبير، الإنتاجية عالية جداً، الصنف متحمل للإصابة بفيروس التفاف أوراق البطاطا leafroll ومتوسط التحمل للإصابة بفيروس A و X، وجيد التحمل للإصابة بفيروس Yntn ، يمتلك المقاومة للنيماتودا البطاطا المتحوصلة، متوسط المقاومة للجرب، عالي التحمل للفيروس PVYntn، حساس نوعاً ما للإصابة بمرض اللفحة المبكرة على الأوراق، وبدرجة أقل بمرض اللفحة المتأخرة على الدرنه، الشكل رقم (2).



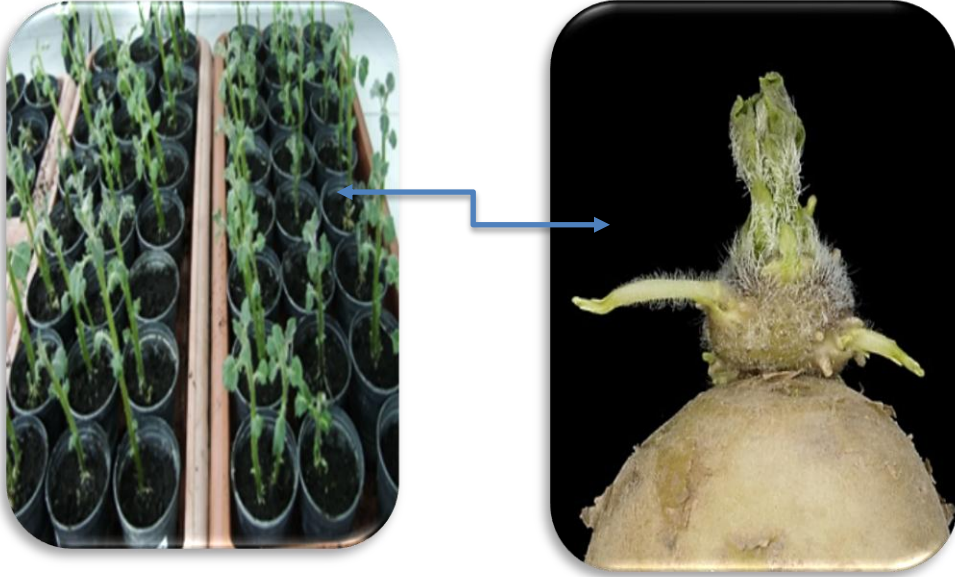
الشكل رقم (2) : درنات الصنف *Solanum.tuberosom .L.C.V.Amarin*

3-3 طرائق البحث *Research Methods*:

3-3-1 زراعة النهايات الوردية: *Rose-end culture*

- جمعت الدرنات المختارة من الصنفين المدروسين ، وفحصت بحيث تكون سليمة وخالية من الأمراض البكتيرية والفطرية والعيوب والتشوهات، وتم إنباتها بإتباع الخطوات التالية:
- غسلت الدرنات بالماء الجاري، لإزالة كل الشوائب، ثم غُومت بحمض الجبرلين (5 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) ، الشكل رقم (3) .



الشكل رقم (3) : زراعة النهايات الوردية لدرنات الأصناف المدروسة

3-3-2 زرع الأنسجة للخرعات النباتية: Plant Explants Tissue Culture stage :

3-3-2-1 مرحلة الزراعة الأولية: Initial culture

جمعت النموات المأخوذة من النهايات الوردية (بعد 45 يوم من الزراعة)، تحت جهاز العزل الجرثومي حيث تم قص النموات إلى عقل مفردة بطول 1-2 سم يحوي كل منها برعم جانبي واحد، وغسلت بالماء الجاري، تم إجراء عملية التطهير السطحي لها (Surface disinfection) حيث غمرت بالكحول الإيثيلي تركيز 70% لمدة 1 دقيقة، مع التحريك ثم غمرت بمحلول التطهير الحاوي على هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتركيز (1 - 2 - 3 - 4 %) (المحلول التجاري 5.25 %) لمدة (10 - 20

دقيقة)، وقد أضيف إلى محلول التطهير بضع نقط من Tween-20 لتخفيف التوتر السطحي وزيادة فعالية التطهير.

ثم غسلت الخزعات النباتية 3 مرات متتالية بالماء المقطر المعقم، وذلك بمعدل (5-10-15) دقائق على التوالي في كل مرحلة من مراحل الغسيل بهدف إزالة كل أثر المادة المستخدمة بالتطهير تمت جميع عمليات التطهير السطحي والزراعة الأولية في ظروف معقمة في غرفة الزراعة ضمن جهاز العزل Laminar air flow Hood وبشروط عقيمة واستخدام أدوات معقمة من مشارط ومقصات وأطباق بتري الشكل رقم (4).



الشكل رقم (4) : تعقيم العينات النباتية

زرعت الخزعات النباتية بعد تطهيرها في الوسط المغذي MS (Murashige و Skooge ، 1962) ، المضاف له 30 غ/ل سكروز و 5.5 غ/ل آجار عالي النقاوة وبدرجة حموضة (pH 5.8 ، الجدول رقم 3) ، وتم توزيع الوسط المغذي في أنابيب اختبار بحجم 2.5 × 20 سم بواسطة موزع المحاليل بمعدل 13 مل من الوسط المغذي في كل أنبوب و عقت في جهاز التعقيم الرطب Autoclave على حرارة 121 م° و ضغط 1.04 كغ/ سم² لمدة 20 دقيقة، ثم زرعت الخزعات النباتية بشكل عمودي على سطح الوسط بطول 0.5 - 1 سم والمكونة من ورقة بإبطها برعم، وتم تحضين العينات النباتية المزروعة في غرفة النمو على درجة حرارة 24 ± 1 م° وإضاءة 16 ساعة/ 8 ظلام و شدة ضوئية 3000 لوكس لمدة 45 يوماً ، علماً أن عدد الأنابيب المزروعة بلغ 75 أنبوباً من كل صنف، وتتراوح مدة التحضين للحصول على نبتة

كاملة (Plantlets) بين 4-5 أسابيع، بعدها تمت إعادة الزراعة (Subculture) مرة كل شهر تقريباً حيث تم إكثارها ثلاث مرات للحصول على العدد الكافي من النباتات اللازمة لبدء التجارب البحثية، . وسجلت في هذه المرحلة النسب المئوية للعينات السليمة والنسب المئوية للعينات النامية من العينات السليمة الشكل رقم (5)، وذلك وفق مايلي:

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

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



الشكل رقم (5) : نمو العينات النباتية بعد الزراعة.

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

تهدف مرحلة الإكثار إلى الحصول على أكبر كمية ممكنة من النموات الخضرية جيدة النمو. تقسم العينات النباتية الناتجة من مرحلة الزرع الأولي إلى عقل صغيرة بطول 1.5-2 سم تحتوي برعم جانبي مع ورقة، وتزرع في نفس وسط الزرع الأولي الوسط المغذي MS الجدول رقم (3)، بهدف الإكثار. كررت عملية الإكثار خمس مرات متتالية للحصول على الكمية الكافية من المادة النباتية اللازمة لتنفيذ التجارب الخاصة باستحداث الكالس وزرع المعلقات الخلوية، مصدر الخزعة النباتية: السلاميات (المسافات بين العقد)، الأوراق.

الجدول رقم (3): تركيب الوسط المغذي لموراشيج وسكوج (MS) (Murashige و Skooge، 1962)

المستخدم في البحث

المركب	التركيب الكيميائي	وسط MS (مغ/ل)	وسط MS* ½ (مغ/ل)
نترات الأمونيوم	NH_4NO_3	1650	825
نترات البوتاسيوم	KNO_3	1900	950
كلوريد الكالسيوم المائي	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	220
سلفات المغنيزيوم المائية	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	185
فوسفات البوتاسيوم	KH_2PO_4	170	85
سلفات الحديد المائية	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	27.85
شلات الصوديوم	Na_2EDTA	37.25	37.25
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	6.6
مولبيدات الأمونيوم المائية	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.83	0.83
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	1
ميواينوزيتول		100	100
سكرور		30 غ/ل	30 غ/ل
أغار عالي النقاوة		5.5 غ/ل	5.5 غ/ل
pH		5.8	5.8

MS* ½: هو وسط مغذي متوسط القوة له التركيب المعدني ذاته لوسط موراشيج وسكوج ولكن يتم فيه تخفيض تراكيز العناصر الكبرى فقط إلى النصف، مع المحافظة على تراكيز العناصر الصغرى.

3-2-3-3 مرحلة استحداث الكالس وإكثاره: Callus Induction and propagation Stage

زرعت الخزعات النباتية السلاميات ، الأوراق على الوسط المغذي MS ودرس تأثير استخدام تراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية لاستحداث الكالس ، ودرس تأثير استخدام تراكيز مختلفة من الأوكسين 2,4-D الجدول رقم (4) ، وبعد ثمانية أسابيع تم تحديد مزيج منظمات النمو الأفضل مع الخزعة الأفضل لاستحداث وتشكل الكالس، وتمت إعادة الزرع كل 21 يوم وتم التحضين في الظلام بشكل كامل على درجة حرارة 24 ± 1 م°، حيث تمت زراعة 5-6 خزعات في كل طبق بتري وبمعدل ثمانية مكررات لكل معاملة ، وكان عدد الأطباق المزروعة في هذه المرحلة:

$$5 \text{ معاملة} \times 2 \text{ صنف} \times 2 \text{ خزعة} \times 8 \text{ طبق} = 160 \text{ طبق.}$$

تضمنت القراءات ما يلي:

- النسبة المئوية لتشكيل واستحداث الكالس = (عدد العينات التي أعطت كالس/العدد الكلي للعينات المزروعة) $\times 100$.

- لون الكالس (أبيض، كريمي، أخضر، بني).

- النسبة المئوية لتشكيل الجذور.

- درجة استحداث وتشكل الكالس وقد أعطيت درجات: (-: 0 سم عدم تشكل كالس، +: 0.5 سم

كالس صغير، ++: 1 سم كالس متوسط، +++: 1-2 سم كالس كبير الحجم، ++++: < 2 سم

كالس ضخمة).

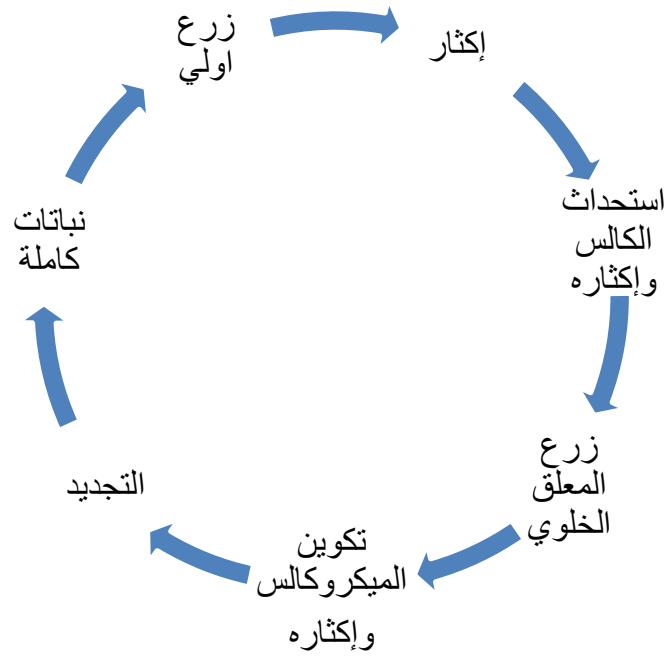
وقد جرى إكثار الكالس لعدة مرات متتالية بتجزئته ونقله إلى الوسط المغذي الجديد (وسط الاستحداث الأمثل).

الجدول رقم (4) : الأوساط المغذية وتركيب المزائج الهرمونية المستخدمة في استحداث وإكثار وتجديد الكالس.

المركب	مرحلة استحداث الكالوس (مغ/ل)	مرحلة التجديد (مغ/ل)
الوسط المغذي	MS	MS
ثيامين	0.5	0.5
بيروكسين	0.5	0.5
حمض النيكوتين	0.5	0.5
حمض الفوليك	0.5	0.5
بيوتين	0.05	0.05
غلايسين	2	2
ميواينوزيتول	100	100
غلوتامين	2	2
سكروز	30000	30000
2,4-D	0,1,2,3,4	-
Zeatin	-	0,0.5,0.75,1,1.5,2
6-Benzyl amino purine	-	0,1,2,2.5,5
Gebrillec Acide	-	0.5
Naphtalin ascetic Acide	-	0.2
أغار عالي النقاوة	5.5	5.5
pH	5.8	5.8

3-2-4 زرع المعلق الخلوي Culture of cell suspension:

أخذت الخزعات من أنواع مختلفة من الكالس الناتج عن المرحلة السابقة (كالس ناتج عن السلامة، كالس ناتج عن الأوراق) لكل من الصنفين المدروسين. تمت زراعة المعلق الخلوي وفقاً لـ (Vargas وزملاؤه، 2005) بنقل (1 غ) من الكالس إلى مصفاية معدنية بقطر (250 و 450 ميكرون) وتجزئة الكالس ميكانيكياً بواسطة ملعقة معدنية معقمة مع إضافة كمية قليلة من الوسط المغذي السائل MS 1/2 للمساعدة على تفتيت الكالس، ثم نقل معلق الخلايا الناتج عن المصفاة إلى (50 مل) من الوسط المغذي السائل MS 1/2 مضافاً له (3 مغ/ل) 2,4-D، في دورق مخروطي سعة (250 مل)، وتم تحريكها لتأمين التهوية بسرعة (100 دورة/ دقيقة) بواسطة حاضنة هزاز رحي، وحضنت على حرارة (25 ± 1م°)، وتم تغيير الوسط المغذي السائل كل (10 يوم) الشكل رقم (6) .

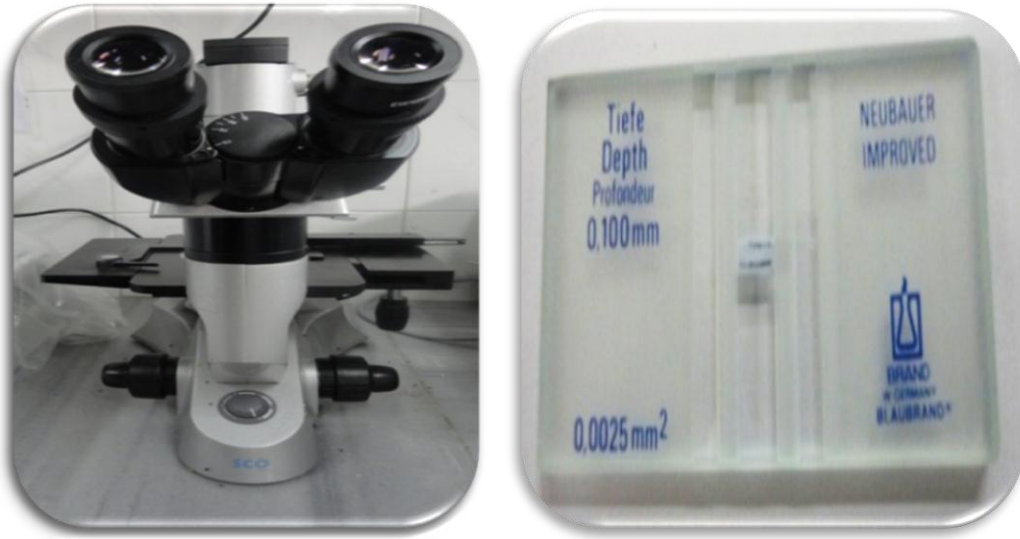


الشكل رقم (6): مخطط عام لزراعة المعلقات الخلوية وتجديدها

3-3-2-4-1 تقدير الكثافة الخلوية:

حددت كثافة المعلق الخلوي باستخدام شريحة عد الخلايا (Neubauer Improved)، وذلك في المربع المركزي المؤلف من 25 مربع صغير، وحيث يقسم كل مربع بدوره إلى 16 مربع الشكل رقم (7-A)، تنظف شريحة العد بالكحول وبواسطة ماصة دقيقة وتوضع في الحجرة المخصصة للعد، وتمت عملية عد الخلايا باستخدام المجهر الضوئي المقلوب (Inverted Microscope) الشكل رقم (7-B) بتكبير $20\times$ ويتم حساب عدد الخلايا في 1 مل من المعلق باستخدام العلاقة التالية :

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



الشكل رقم (7):

a - شريحة عد الخلايا B- المجهر الضوئي المقلوب

3-3-2-4-2 تقدير معدل الانقسام الخلوي: تم وفقاً لـ (Felipe و Gregorio، 2006) وفق

المراحل التالية:

1. يؤخذ 5 مل من المعلق الخلوي ويمزج مع 1 مل من المزيج (3:1) (كحول : حمض الخل الثلجي) لمدة 30 دقيقة.

2. تنتقل عينات الخلايا إلى شريحة زجاجية ويضاف لها كمية مساوية من محلول الصبغة كربول - فوسين (carbol-fuschin)، الذي يحضر كما يلي:

أ- محلول A : يحل 3 غ من فوسين في 100 مل كحول 70%.

ب- محلول B : يضاف 10 مل من محلول A إلى 90 مل من فينول 5% ممد بالماء المقطر .

ت- محلول كربول - فوسين : يضاف 45 مل من محلول B إلى 6 مل من حمض الخل الثلجي +6 مل من فورمول 37% .

3. ننتظر لعدة دقائق ، ثم نغطي المحضر بساترة ونسخن حتى تظهر فقاعات صغيرة .

4. نغطي الشريحة بواسطة نسيج ورقي ونسحق المحضر ، ويتم عد النوى في مرحلة الانقسام الخلوي

(الميتوزي) ثم يحسب معدل الانقسام الخلوي (MI (mitotic index) من العلاقة التالية :

معدل الانقسام الخلوي MI = (عدد الخلايا في مرحلة الانقسام الخلوي / العدد الكلي للخلايا في المعلق الخلوي) $\times 100$.

3-4-2-3-3 تقدير حيوية الخلايا باختبار TTC

وتم تقدير حيوية الخلايا باستعمال تقنية اختبار TTC وفقاً لـ (Castro-Concha وزملاؤه،

2006)، الذي يقدّر حيوية المعلقات الخلوية من خلال إرجاع مادة triphenyl tetrazolium

chloride (TTC) عديمة اللون إلى مادة Formazan ذات اللون الأحمر، وذلك بواسطة أنزيم

Succinate dehydrogenas وذلك حسب ما يلي:

1- يغسل 1 مل من المعلق الخلوي بمحلول موقى فوسفاتي تركيزه 50 mM و pH=7.5.

2- يعاد زرع الخلايا ضمن 1 مل من المحلول الموقى نفسه.

3- يضاف 1.5 أو 2.5 mM من TTC.

4- يتم التحضين لمدة 8 ساعة في الظلام على حرارة 25 °م.

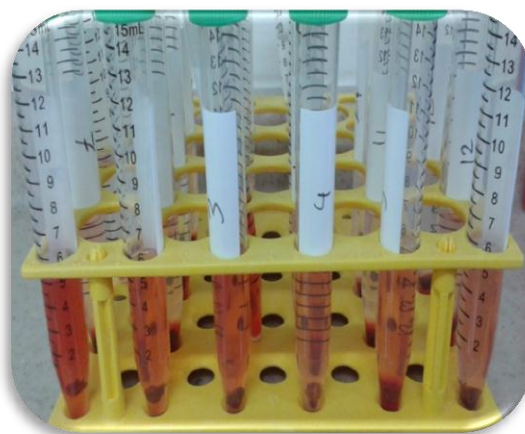
5- ثم يتم استخلاص الفورمازان ب 1.5 مل من ميثانول 50% ، يحتوي على SDS 1% ، على حرارة 60 °م لمدة 30 دقيقة.

6- يتم التثقيب على سرعة 1875 لمدة 5 دقائق.

7- تعاد الخطوات 5 و 6 .

8- ثم تقرأ الامتصاصية طول موجة 485 نانومتر لتقدير تركيز مادة الفورمازان عن طريق قياس الامتصاص الضوئي على جهاز المطياف الضوئي ، حيث يوجد تناسب طردي بين شدة اللون الأحمر وحيوية الخلايا، وتشير شدة اللون الأحمر إلى إنتاج كمية أكبر من مادة الفورمازان، وبالتالي نشاط أكبر

لأنزيم Succinate dehydrogenas، ومن ثم حيوية أكبر للخلايا (Burke و Orzech، 1988)
الشكل قم (8)، كررت التجربة في هذه المرحلة مرتين.



الشكل رقم (8): تقدير حيوية الخلايا باختبار TTC

3-3-2-5 مرحلة تكوين الميكروكالس وإكثاره: Micro callus formation and propagation Stage

نقلت الخلايا المفردة والمجاميع الخلوية المتشكلة في المعلقات الخلوية إلى أطباق بتري بقطر 9 سم تحوي الوسط المغذي MS ، بحيث يضاف لكل طبق بتري 2 مل من المعلق الخلوي، وتمت عملية الزرع باستخدام ماصة دقيقة وعقيمة، وصولاً لمرحلة تشكل الميكروكالس من معلقات الأوراق و السلاميات للصفين المدروسين، ثم جرى بعد ذلك إكثار الميكروكالس وتتميته للحصول على كمية كافية لمرحلة التجديد.

3-3-2-6 مرحلة تجديد الكالس Callus regeneration Stage :

واستخدم لتجديد الكالس الوسط المغذي مع المزائج الهرمونية MS ، حيث تم دراسة تأثير نوعين من منظمات النمو النباتية من السيتوكينات الزياتين (Z)، و بنزيل أمينو بيورين (BAP) الجدول رقم (4) ،

لتحديد المزيج الهرموني الأفضل مع الخزعة الأفضل من خلال دراسة نسبة تشكل الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية.

تم زراعة 6 أطباق بتري لكل معاملة وكررت التجربة مرتين فيكون عدد الأطباق المزروعة في هذه المرحلة : 10 معاملة $\times$ 2 صنف $\times$ 2 خزعة $\times$ 6 طبق = 240 طبق بتري.

3-3-3 التوصيف الجزيئي على مستوى الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA)

: Molecular characterization on the DNA level

1-3-3-3 استخلاص الدنا DNA extraction

- عزل الـ DNA (Genomic DNA) من أوراق (خالية من الإصابات الظاهرية) مأخوذة من نباتات بعمر 30 يوم ومن الكالس العضوي المتكون عن المعلقات الخلوية للصنفين المدروسين بعمر 30 يوم بطريقة الـ Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) المعدلة (Murray و Thompson، 1980)، حيث وزن 0.2 غ من الأوراق النباتية و الكالس المتشكل عن المعلقات لكل عينة، وطحنت في هاون بوجود الآزوت السائل N2 liquid طحناً ناعماً حتى أصبحت على شكل مسحوق.
- نقل المسحوق النباتي إلى أنابيب معقمة سعة 2 مل ، ثم أضيف لكل عينة 750 ميكروليتر من محلول الاستخلاص CTAB والمسخن مسبقاً على درجة حرارة 60 °م لتعطيم الجدر الخلوية وتحرير المكونات الخلوية بما فيها الـ DNA والذي يحتوي على:
[2% (w/v) CTAB ، 100 mM Tris-HCl (pH 8)، 1.4 M NaCl، 20 mM EDTA (pH 8) ، 0.2 % 2-β-mercaptoethanol (v/v)].
- وضعت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 60 °م مع التحريك المستمر بالتقليب كل 15 دقيقة مدة 60 دقيقة.

- أضيف 750 ميكروليتر من chloroform/ isoamyl alchohol (1:24) لكل عينة وحركت جيداً بالتقليب لفصل الـ DNA عن البروتينات وباقي المكونات الخلوية.
- وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي ماركة Heraeus على سرعة 12000 دورة/ د مدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، حيث تم في هذه المرحلة فصل المزيج إلى ثلاث طبقات: الطبقة العليا (الطور المائي) ويحوي الـ DNA، الطبقة الوسطى وتحوي البروتينات والطبقة السفلى وتحوي الكلوروفورم.
- نقل بعدها الطور الطافي (المحتوي على DNA) إلى أنابيب جديدة سعة 2 مل، وأعيدت تنقيته مرة أخرى بكمية مماثلة لحجم الطور المائي من مادة chloroform/ isoamyl alchohol (1:24).
- أضيف ما يعادل ثلثي حجم الطور المائي المنقول من isopropanol المبرد على حرارة -20 م° مع التحريك الخفيف، وتركت العينات بعدها على درجة حرارة -20 م° طوال الليل من أجل ترسيب الـ DNA.
- في اليوم التالي تم التنقيط بسرعة 10000 دورة / د مدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 م° بعد أن ذابت العينات في حرارة الغرفة، ثم تم التخلص من الرشاحة وغسل الراسب (DNA) بإضافة 1 مل من إيثانول 70% المبرد مسبقاً بالتقليب عدة مرات.
- ثقلت الأنابيب بعد ذلك على سرعة 10000 دورة/ د لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، واستبعد الجزء الطافي وجفف راسب DNA على حرارة 37 م° لمدة 20 دقيقة، ثم أذيب DNA في 100 ميكروليتر من الماء المقطر المعقم.
- تم التخلص من الـ RNA بإضافة 2 مل من أنزيم RNase (10 مغ/ مل) والتحصين على درجة 37 م° مدة نصف ساعة.
- خزنت العينات على درجة حرارة -20 م° لحين الاستخدام.

الجدول رقم (5) : ترميز DNA العينات المدروسة للصنفين أمارين وتشالنجر

الرمز	DNA العينة المدروسة
V1	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق الصنف أمارين في وسط تجديد يحتوي على BAP
V2	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات سلاميات الصنف أمارين في وسط تجديد يحتوي على BAP
V3	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق الصنف أمارين في وسط تجديد يحتوي على Z
V4	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات سلاميات الصنف أمارين في وسط تجديد يحتوي على Z
V5	DNA عينة النبات الأم من الصنف أمارين
V6	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق الصنف تشالنجر في وسط تجديد يحتوي على BAP
V7	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات سلاميات الصنف تشالنجر في وسط تجديد يحتوي على BAP
V8	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق الصنف تشالنجر في وسط تجديد يحتوي على Z
V9	DNA عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات سلاميات الصنف تشالنجر في وسط تجديد يحتوي على Z
V10	DNA عينة النبات الأم من الصنف تشالنجر

3-3-2 تقدير كمية الـ DNA و نوعيته Estimate of the amount of DNA and its quality:

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

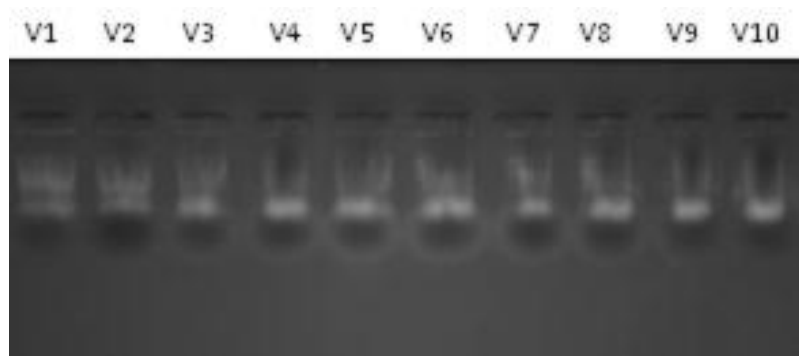
إن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر/ إلى قراءة 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الـ DNA، ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8-2.0، الجدول رقم (6).

وتم حساب تركيز الـ DNA من المعادلة التالية (Maniatis، 1982):

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

حيث أن OD 260 تمثل الامتصاصية عند الموجة 260 نانومتر، الجدول رقم (6).

حُمِلت كمية قليلة من الـ DNA (6 ميكرو ليتر)، في هلامة من الأغاروز تركيزها 1% لتحديد نوعية الـ DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها، حيث يجب أن يظهر الـ DNA على شكل عصابات bands عالية الوزن الجزيئي في هلامة الأغاروز الشكل رقم (9). ثم مُدِدَت عينات الـ DNA للحصول على تركيز موحد (50 نانوغرام / ميكرو لتر) لتستخدم في التفاعل التسلسلي البوليمرازي.



الشكل رقم (9): نوعية DNA للعينات المدروسة من خلال الترحيل على هلامة أغاروز 1%.

الجدول رقم (6): الكثافة الضوئية لعينات DNA المدروسة عند الموجتين 260 و 280 نانومتر، ونوعية الـ DNA وتركيزه

تركيز عينة (µg /ml) DNA	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀	رمز العينة
3.490	1.82	0.383	0.698	V1
2.665	1.80	0.296	0.533	V2
2.430	1.75	0.277	0.486	V3
3.290	1.92	0.342	0.658	V4
2.355	1.84	0.255	0.471	V5
2.420	1.92	0.250	0.484	V6
2.260	1.94	0.232	0.452	V7
2.365	1.83	0.258	0.473	V8
2.090	1.80	0.232	0.418	V9
2.455	1.77	0.276	0.491	V10

3-3-3-3 التفاعل التسلسلي للبوليمراز (Polymerase Chain Reaction (PCR):

تم تضخيم الـ DNA باستخدام 17 مرئسة للتكرارات التتابعية البسيطة الداخلية ISSR الجدول رقم (7) التي تم الحصول عليها من شركة VBC-Biotech & Eurofins Genomics (VBC) الأوروبية. الجدول رقم (7): مرئسات الـ ISSR المستخدمة في تضخيم DNA العينات المدروسة

رمز المرئسة	الاسم	التسلسل النيكليوتيدي	درجة حرارة الالتحام (°م)
Pr1	SLISSR 1	(CCA)5	50
Pr2	SLISSR 2	GAG(CAA)5	60
Pr3	814	(CT)8TG	54
Pr4	844A	(CT)8AC	54
Pr5	844B	(CT)8GC	56
Pr6	17899B	(CA)6GG	44
Pr7	17899A	(CA)6AG	42
Pr8	SLISSR 9	(AG)8	48
Pr9	HB13	(GAG)3GC	38
Pr10	17898B	(CA)6GT	42
Pr11	SLISSR 12	(CAC)5	50
Pr12	HB14	(CTC)3GC	38
Pr13	SLISSR 14	(GA)8GG	56
Pr14	SLISSR 15	(AG)8TG	54
Pr15	SLISSR 16	(ATG)5	40
Pr16	SLISSR 17	(GCC)5	60
Pr17	17898A	(CA)6AC	42

أجري التفاعل التسلسلي البوليميرازي في حجم نهائي قدره 25 ميكروليتر يحوي على 12.5 ميكروليتر من Thermo Scientific Dream Taq PCR Master Mix الذي تم الحصول عليه من شركة Thermo Scientific والمحتوي على المكونات الآتية: (Taq-Polymerase، dNTPs، $MgCl_2$)، 11.5 ميكروليتر من الماء المقطر المعقم، 1 ميكروليتر من المرئسة، 1 ميكروليتر من الـ DNA. استخدم جهاز المدور الحراري (من شركة APOLLO، USA ماركة ATC401) وفق البرنامج الحراري التالي:

⊕ المرحلة الأولى (مرحلة الفصل الأولي): وتتم لمرة واحدة على درجة حرارة 95 م لمدة 5 دقائق.

⊕ المرحلة الثانية: تكرر 40 مرة وتضم الخطوات التالية:

⊕ مرحلة الفصل Denaturation: انفصال شريطي الـ DNA عن بعضهما بعد تعريضه لدرجة حرارة 95 م° مدة دقيقة واحدة، تؤدي إلى وقف التفاعلات الأنزيمية وفصل سلسلتي الـ DNA عن بعضهما لتصبحا سلسلتين مفردتين.

⊕ مرحلة الالتحام Annealing: وهي مرحلة التحام المرئسة على القطعة الأصلية من الـ DNA عن طريق تخفيض درجة الحرارة إلى الحرارة المناسبة بحسب المرئسة المستخدمة مدة دقيقة واحدة، حيث يلتصق المرئسة على الـ DNA في المكان المناسب، ويقوم أنزيم البوليميراز في إكمال السلسلة المتممة ومضاعفة سلسلة DNA.

⊕ مرحلة الاستطالة Extension: وهي مرحلة تركيب السلسلة الجديدة المكتملة للقطعة الأصلية من الـ DNA، باستخدام نيكليوتيدات مفردة ثلاثية الفوسفات ATP، CTP، GTP، TTP وبمساعدة أنزيم البوليميراز، من خلال رفع درجة الحرارة إلى 72 م° مدة دقيقة واحدة.

⊕ المرحلة الثالثة (مرحلة الاستطالة النهائية): وتتم لمرة واحدة على درجة حرارة 72 م° مدة 5 دقائق.

بعد انتهاء هذا التفاعل تم الحصول على عدد كبير من سلاسل DNA حفظت في درجة حرارة -20 م° .

3-3-4 الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج الـ PCR Electrophoresis, Staining and imaging of the PCR products

تم فصل نواتج عمليات التضخيم في جهاز الرحلان الكهربائي على هلام من الأغاروز ذات تركيز 2% في محلول 1X TBE (Sambrook وزملاؤه، 1989) المكون من 89 mM من الـ Tris، 89 mM من حمض البوريك، 2 mM من الـ EDTA (PH 8)، بوجود مؤشر ذو وزن جزيئي 2000 bp (KAPA Universal Ladder, KAPA BIOSYSTEMS) لمعرفة الأوزان الجزيئية التقريبية لنواتج التضخيم.

استمر الترحيل لمدة ساعة ونصف على جهد 90 فولت، وصبغت الهلامة بمحلول الإيثيديوم برومايد Ethidium bromide تركيز $0.2 \mu\text{g/ml}$ ، وصورت الهلامة بوجود الأشعة فوق البنفسجية وذلك للكشف عن التعددية الشكلية.

5-3-3-3 التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي Experimental Design and Statistical

:analysis

تم تصميم التجربة وفق القطاعات العشوائية الكاملة RCD، وتم التحليل الإحصائي للناتج باستخدام برنامج XLSTAT 2014 (XLSTAT, 2014)، وجرت مقارنة المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.01.

لدراسة التباين الوراثي، تم تحديد حجم حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج TotalLab (Ultra· Lum Inc., Claremont, Calif.) ثم تم تحديد التباين الوراثي كما يلي:

- تحديد عدد الحزم الكلية في عينتي DNA للنبات الأم للصنفين المدروسين أمارين وتشالانجر.
- تحديد عدد الحزم المتشابهة بين DNA عينات الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لكل صنف على حدة.

- تحديد عدد الحزم المتباينة والغائبة (غير المتشابهة) في DNA عينات الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لكل صنف على حدة.

- حساب النسبة المئوية للتباين الوراثي الناتج عن تأثير الخزعة (الأوراق والسلاميات)، وعن وسط التجديد (BAP و Z) ولكل صنف على حدة وفقاً للعلاقة التالية:

- النسبة المئوية للتباين الوراثي = [عدد الحزم غير المتشابهة / (عدد الحزم المتشابهة + عدد الحزم غير المتشابهة)] $\times 100$.



الفصل الرابع: النتائج والمناقشة

RESULTS AND DISCUSSION

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 مرحلة الزراعة الأولية: Initial culture :

4-1-1 التطهير السطحي والزراعة التأسيسية Disinfection and culture establishment :

يُعد التطهير السطحي من المراحل المهمة في زراعة الأنسجة، ويختلف من حيث الوقت اللازم للتطهير، ونوع وتركيز المادة المستخدمة في التطهير، كما تهدف عملية التطهير السطحي للتخلص من البكتيريا والفطريات التي قد تتواجد على الجزء النباتي المراد زراعته، و تستخدم مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl نظراً لفعاليتها في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً (Jelaska و Pevalek ، 1987 ، المعري، 1995). حيث تتميز بفعالية عالية في تطهير الخزعات النباتية قليلة التلوث السطحي خاصة إذا استخدمت بالتراكيز المناسبة مقارنة مع مواد أخرى مثل هيبوكلوريت الكالسيوم ، و الذي يعزى انخفاض تأثيره إلى انخفاض معدل نفاذيته عبر الأغشية الخلوية (Jona و Menini، 1987) ، أو مقارنة مع كلوريد الزئبق و الذي تؤدي التراكيز المرتفعة منه إلى تهتك الأنسجة و سميتها و بشكل عام فإنه للحصول على أفضل نمو في النبات و أعلى نوعية للعينات السليمة فيجب البدء أساساً من مادة نباتية (explant) خالية من التلوث (Yashino و Hashimoto ، 1977). حيث تم اجراء عدة تجارب لتحديد الطريقة المثلى للتطهير والزراعة على وسط MS خال من الهرمونات (وسط الزراعة الأولية) وباستخدام أربعة تراكيز من هيبوكلوريت الصوديوم (1,2,3,4%) لمدة 10مع إضافة Tween-20 الذي يساعد على نشر وزيادة فعالية مادة التعقيم وخفض التوتر السطحي للجزء النباتي المراد زراعته.

تبين نتائج الجدول (8) بأن التطهير السطحي بهيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) لمدة 20 دقيقة عند كل التراكيز المستخدمة قد أدى لموت كافة العينات النباتية ، بينما كانت أفضل نتائج التطهير السطحي عند التركيزين (3- 4%) لمدة عشرة دقائق لكلا الصنفين ، ففي الصنف البطاطا أمارين تفوق التركيزين

4% و 3% معنوياً على بقية التراكيز، وكانت نسبة العينات السليمة 92% و 90% على التوالي، وانخفضت معنوياً نسبة العينات السليمة بنسبة بلغت 25% عند التركيز 1% ، بينما تفوق التركيز 4% معنوياً على بقية التراكيز في نسبة العينات النامية حيث بلغت 80% ، بينما انخفضت معنوياً نسبة السليمة والنامية عند استخدام التركيز 1% من هيبوكلوريت الصوديوم بنسبة بلغت 25% للعينات السليمة، و 20% للعينات النامية. أما بالنسبة للصنف تشالنجر فقد تفوق التركيز 4% معنوياً على بقية التراكيز وكانت نسبة العينات السليمة 94% ، وبلغت 80% عند التركيز 3%، وتفوق التركيزين 4% و 3% معنوياً على بقية التراكيز وبلغت نسبة العينات النامية عند هذين التركيزين 90% و 75% على التوالي، بينما انخفضت معنوياً نسبة العينات السليمة والنامية عند استخدام التركيز 1% من هيبوكلوريت الصوديوم بنسبة بلغت 30% للعينات السليمة ، 25% للعينات النامية. أما بالنسبة لصنفي البطاطا المدروسين لم تسجل أية فروق معنوية بينهما بالنسبة لتأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم في تطهير الأجزاء النباتية، وهذه النتيجة تتوافق مع كثير من الأبحاث التي أشارت إلى أهمية هيبوكلوريت الصوديوم في تعقيم الأجزاء النباتية المختلفة لنبات البطاطا (Love، 1987 ؛ Al Maarri وزملاؤه، 2012).

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.

الجدول رقم (8): تأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم في تطهير الأجزاء النباتية لصنفين من البطاطا المدروسة

الأصناف				% (NaOCl)
تشانلجر		أمارين		
نسبة العينات النامية %	نسبة العينات السليمة %	نسبة العينات النامية %	نسبة العينات السليمة %	
0.0 ^e	0.0 ^e	0.0 ^e	0.0 ^e	0
25 ^d	30 ^d	20 ^d	25 ^d	1
55 ^c	65 ^c	40 ^c	55 ^c	2
75 ^b	80 ^b	76 ^b	90 ^b	3
90 ^a	94 ^a	80 ^a	92 ^a	4
0.157	0.222	0.44	1.11	LSD _{0.01} التفاعل
10.27			11.334	LSD _{0.01} الصنفين

يشير اختلاف الأحرف الصغيرة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن الطراز الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة إلى وجود فروق معنوية بين الطرز عند مستوى ثقة 99%.

4-1-2 مرحلة الإكثار Propagation stage:

تم إكثار النباتات الناتجة من مرحلة الزراعة الأولية مرة كل أربعة أسابيع الشكل رقم (10) ، وذلك بمعدل خمس مرات متتالية بحيث تم الحصول على العدد الكافي من المادة النباتية لتنفيذ تجارب البحث.



الشكل رقم (10): زرع الخزعات النباتية في مرحلة الإكثار.

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

2-4 استحداث الكالس Callus Induction:

تؤدي منظمات النمو النباتية دوراً أساسياً في زراعة الأنسجة عند البطاطا وغالباً ما يكون للأوكسين 2,4-D الدور الأهم في استحداث الكالس، وتكوين الكالس الجنيني، (Rashid وVikrant ، 2003).

1-2-4 الصنف أمارين Amarin Variety :

تفوق التركيز 3مغ/ل من الأوكسين 2,4-D على التراكيز الأخرى من حيث النسبة المئوية لاستحداث الكالس من الاوراق الشكل رقم (10) ، حيث أعطى أعلى نسبة لاستحداث الكالس مع عدم وجود فروق معنوية بين التركيز 3مغ/ل والتركيز 2مغ/ل من الأوكسين 2,4-D حيث بلغت % استحداث الكالس من الأوراق 96 % ، 80 % على التوالي، حيث كانت أقل قيمة معنوياً لصفة النسبة المئوية لاستحداث الكالس (68%,60%) عند التركيزين 4-1مغ/ل على التوالي مع عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين. ويذكر أنه لم تسجل استجابة لاستحداث الكالس على وسط خالٍ من 2,4-D.

وبالنسبة لصفة تشكل الجذور بلغت اعلى نسبة لتشكل الجذور من الكالس المستحدث من الاوراق عند التركيز 1مغ/ل 2,4-D ونسبته 44% مع عدم وجود فروق معنوية مع التركيز 2مغ/ل حيث بلغت النسبة 32%، في حين كانت النسبة 8% مع وجود فروق معنوية عند التركيز 3مغ/ل.

وبشكل مماثل بالنسبة للكالس المستحدث من سلاميات الصنف أمارين ، الشكل رقم (11) ، تفوق التركيز 3مغ/ل 2,4-D على التراكيز الأخرى من حيث النسبة المئوية لاستحداث الكالس حيث أعطى أعلى قيمة معنوية النسبة المئوية استحداث مع عدم وجود فروق معنوية بين التراكيز 3مغ/ل، و2مغ/ل حيث كانت النسبة (92% , 76%) على التوالي ،

وكانت أقل قيمة معنوياً لاستحداث الكالس من السلاميات (52% , 44%) عند التركيزين 4-1مغ/ل على التوالي مع عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين، وكذلك لم يتشكل كالس على وسط خالٍ من الأوكسين المستخدم.

كما تشكلت الجذور على كالس المستخدم من سلاميات الصنف أمارين حيث بلغت أعلى نسبة 8% عند التركيز بين 1-2 مغ/ل 2,4-D و 4% عند التركيز 3 مغ/ل ، في حين لم تتشكل عند التراكيز 4مغ/ل مع عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات المذكورة.

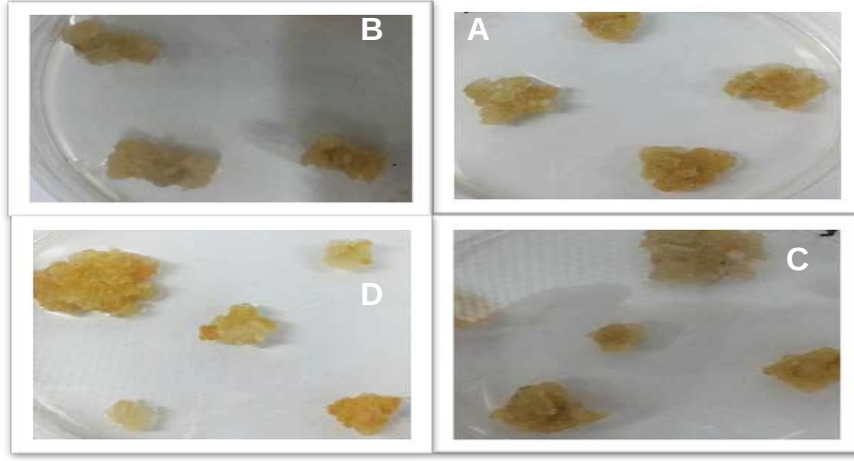
وبمقارنة الكالس المستحدث من أوراق الصنف أمارين مع الكالس المستحدث من السلاميات، بينت نتائج الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين (الأوراق والسلاميات) كخزعات نباتية لاستحداث الكالس وذلك بالنسبة لضعف استحداث الكالس وتشكل الجذور الجدول (9) حيث كانت التركيز الأمثل 3 مغ/ل من 2,4-D (96% , 8%) على التوالي من الأوراق، (92% , 4%) على التوالي من السلاميات .

4-2-2 الصنف تشالنجر Challenger Variety :

تم استحداث الكالس من الخزعات النباتية (الأوراق والسلاميات) للصنف تشالنجر الشكل رقم (11) ، حيث بلغت أعلى قيمة معنوية للنسبة المئوية لاستحداث الكالس 100% من التركيز 3مغ/ل مع عدم وجود فروق معنوية مع المعاملات الأخرى (1-2-4) مغ/ل حيث كانت النسبة (96%, 96%, 92%) على التوالي.

وبالنسبة لصفة تشكل الجذور من الكالس المستحدث من الأوراق فقد تشكلت الجذور عند استخدام التركيز 1 مغ/ل فقط ونسبته بلغت 12% في حين لم تتشكل باستخدام التركيز الأعلى، يذكر أنه لم يتشكل الكالس من الأوراق بغياب الأوكسين من وسط الاستحداث، في حين بلغت أعلى قيمة معنوية للنسبة المئوية لاستحداث الكالس من السلاميات 92% عند التركيز 3 مغ/ل مع عدم وجود فروق معنوية مع التركيزين 2 و 4 مغ/ل وبلغت النسبة 84% لكلا المعاملتين وبفروق معنوية مع التركيز 1 مغ/ل وبنسبة 64%، وقد تميز الكالس المستحدث من سلاميات الصنف تشالنجر بانعدام تشكل الجذور في كل المعاملات، ولم تظهر استجابة للكالس بغياب الأوكسين. كذلك أظهرت نتائج الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين الأوراق والسلاميات كخزعات نباتية لاستحداث الكالس للصنف تشالنجر، حيث

تفوق التركيز 3 مغ/ل 2,4-D على باقي التراكيز لصفة النسبة المئوية لاستحداث الكالس، والنسبة المئوية لتشكيل الجذور (12%، 0%) على التوالي لكلا الصفتين من كالس الأوراق و (92%، 0%) من كالس السلاميات. معنوية بين متوسطات الصنفين المدروسين من حيث صفة النسبة المئوية لاستحداث الكالس هذه النتائج تتوافق وبمقارنة نتائج استحداث الكالس من الصنفين أمارين وتشالنجر فقد أظهرت النتائج عدم وجود فروق مع Shirin وزملاؤه (2007) حيث أظهرت أن 3 مغ/ل 2,4-D وحده هو التركيز الأمثل لاستحداث الكالس مقارنة مع غيره من ممرضات النمو، وتتوافق أيضاً مع نتائج دراسة Abd-Elaleem وزملاؤه (2009) لتأثير ممرضات النمو النباتية على استحداث الكالس في صنف البطاطا Diamant، إذ استخدموا MS مضافاً له تراكيز مختلفة من NAA، 2,4-D، BAP، و TDZ لوحدها ومزيج من 2,4-D مع BAP، تم الحصول على أفضل كالس جيد التكوين على وسط MS مضافاً له 3 مغ/ل 2,4-D لوحده.



الشكل رقم (11) : الكالس المستحدث: A- كالس من أوراق أمارين، B- كالس من سلاميات أمارين

C- كالس من أوراق تشالانجر D- كالس من سلاميات تشالانجر.

إن هذا الدور الذي يؤديه الأوكسين في استحداث الكالس يعزى إلى أن الأوكسينات تشجع الانقسام الخلوي الميتوزي، إذ يعمل الأوكسين على زيادة اصطناع الأحماض النووية RNA، كما ينشط عمل الأنزيمات التي تعمل بدورها على تنشيط التفاعلات الكيميائية اللازمة لتأمين المواد الضرورية للانقسام الخلوي مثل تنشيط عمل أنزيم RNA polymerase (المعري، 1995). ومن حيث صفة درجة الكالس المتشكل، أظهرت الأوراق استجابة أفضل من السلاميات في كلا الصنفين المدروسين وباختلاف تركيز الأوكسين.

تدرج لون الكالس الناتج بين الأبيض الكريمي والكريمي، ولوحظ ازدياد تلون الكالس مترافقاً مع زيادة تركيز الأوكسين المستخدم ليصبح بنياً داكناً مع ازدياد عمر النسيج وتماوته. إذ أنه عند استخدام 2,4-D بتركيز مرتفعة يؤدي إلى انقسام خلوي سريع في مراحل مبكرة من الاستحداث يعقبها اضطراب في استقرار تشكل الكالس ثم انخفاض في معدل انقسام الخلايا (Trigiano و Gray، 2000)، يليها تماوت لنسيج الكالس لنفاذ الوسط المغذي من جهة وبدء اسمراره وإصابته بظاهرة الشفافية بسبب إنتاج الخلايا للإيتلين بكميات كبيرة (Corchete وزملاؤه، 1990).

الجدول رقم (9) : تأثير نوع الخزعة النباتية وتركيز الأوكسين 2,4-D في نسبة استحداث الكالس وتشكل الجذور في أصناف البطاطا المدروسة

الصنف								تركيز 2,4-D (مغ/ل)	الخزعة النباتية
تشانجر				أمارين					
تشكل الجنور %	لون الكالس	درجة تشكّل الكالس	استحداث الكالس %	تشكل الجنور %	لون الكالس	درجة تشكّل الكالس	استحداث الكالس %		
0 ^a	–	–	0 ^b	0 ^b	–	–	0 ^c	0	الأوراق
12 ^a	كريمي	+	44 ^a	44 ^a	أبيض كريمي	++	68 ^b	1	
0 ^a	كريمي	++	76 ^a	22 ^{ab}	أبيض كريمي	++	80 ^{ab}	2	
0 ^a	كريمي	+++	92 ^a	8 ^b	كريمي	+++	96 ^a	3	
0 ^a	كريمي	++	52 ^a	8 ^b	أبيض كريمي	+++	60 ^b	4	
2.4 ^A			52.80 ^A	16.4 ^A			60.80 ^A	المتوسط	
4.39			13.46	29.32			27.87	LSD _{0.01}	
–	–	–	0 ^c	0 ^a	–	–	0 ^c	0	السلاميات
–	أبيض كريمي	+	64 ^b	8 ^a	أبيض كريمي	+	44 ^b	1	
–	أبيض كريمي	++	84 ^{ab}	8 ^a	كريمي	+	76 ^{ab}	2	
–	كريمي	++	92 ^a	4 ^a	كريمي	++	92 ^a	3	
–	كريمي	++	84 ^{ab}	0 ^a	كريمي	+	52 ^b	4	
–			64.8 ^A	4 ^A			52.8 ^A	المتوسط	
–			24.93	14.39			32.19	LSD _{0.01}	
9.68			19.05	21.95			28.62	LSD _{0.01} للصنف	
16.55							23.72	LSD للتفاعل بين الأصناف والتراكيز	
0.01									

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

3-4 زرع المعلقات الخلوية:

تم زرع المعلقات الخلوية للصنفين المدروسين من خلايا كالس أبيض اللون متفتت بعمر (4 أسابيع) والذي تم إكثاره لمدة (8 أسابيع) الشكل رقم (12) ، حيث استخدم لتجزئة الخلايا مصفاية معدنية بقطر (250 و 450 ميكرون) للوقوف على خصائص المعلقات الخلوية الناتجة عنه، وقدرت بعض مؤشرات النمو (الكثافة الخلوية، معدل الانقسام الخلوي، وحيوية الخلايا) كل أسبوع.

1-3-4 الكثافة الخلوية:

1-1-3-4 الكثافة الخلوية للمعلقات الخلوية للصنف أمارين:

- بدءاً من الأوراق: يظهر الجدول (10)، أنه عند استخدام المصفاة المعدنية بقطر 250 ميكرون كان له تأثير واضح على الكثافة الخلوية حيث بلغت أقصاها ($10^4 \times 20.67$ ، $10^4 \times 21.00$) خلية / مل في الأسبوعين الثالث والرابع على التوالي وبفروق معنوية مقارنة مع استخدام المصفاة المعدنية بقطر 450 ميكرون حيث كانت أعلى قيمة لها ($10^4 \times 12.67$ ، $10^4 \times 15.33$) خلية / مل في الأسبوعين الثالث والرابع على التوالي.
- بدءاً من السلاميات: لم توجد فروق معنوية بين القطرين 250 ميكرون و 450 ميكرون كعامل محدد لحجم الخلايا المستخدمة في زرع المعلقات الخلوية مع تفوق غير معنوي للحجم 450 ميكرون ($10^4 \times 21.67$ ، $10^4 \times 23.67$) خلية / مل في الأسبوعين الثالث والرابع على التوالي مقارنة مع الحجم $250 \mu m$ ($10^4 \times 14.00$ ، $10^4 \times 16.33$) خلية / مل.

أظهرت نتائج الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين المعلقات الخلوية المزروعة بدءاً من الأوراق والسلاميات للصنف أمارين، حيث كانت المتوسطات متساوية معنوياً ($10^4 \times 16.67$ ، $10^4 \times 18.17$) خلية / مل للأسبوعين الثالث والرابع على التوالي لمعلقات الأوراق و ($10^4 \times 18.33$ ،

$10^4 \times 19.00$ خلية / مل للأسبوعين الثالث والرابع على التوالي لمعلقات السلاميات، وقد يعزى ذلك إلى أن التركيب الوراثي متماثل في الأوراق والسلاميات ضمن الصنف ذاته.

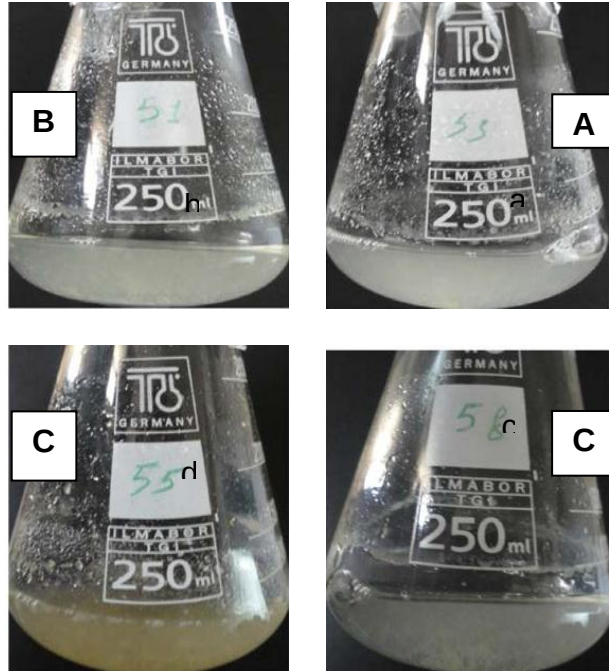
2-1-3-4 الكثافة الخلوية للمعلقات الخلوية للصنف تشالنجر:

• بدءاً من الأوراق: بلغت المعلقات الخلوية عند استخدام المصفاة المعدنية بقطر 250 ميكرون مرحلة الثبات بشكل مبكر في الأسبوع الثاني وبكثافة خلوية $10^4 \times 19.67$ خلية / مل وتزداد إلى 21.33 $10^4 \times$ خلية / مل في الأسبوع الثالث، وتبلغ أقصاها في الأسبوع الرابع $10^4 \times 22.67$ خلية / مل، مع عدم وجود فروق معنوية مقارنة مع المعلقات الخلوية التي استُخدمت المصفاة ذات القطر 450 ميكرون في زرعها، حيث بلغت الكثافة الخلوية في الأسبوع الثالث $10^4 \times 19.67$ خلية / مل، وتصل أقصاها $10^4 \times 28.33$ خلية / مل مع دخول المعلقات الأسبوع الرابع.

• بدءاً من السلاميات: لوحظ أن المعلقات الخلوية التي زرعت باستخدام مصفاية بقطر 250 ميكرون وصلت لمرحلة الثبات في الأسبوع الثاني وبكثافة خلوية $10^4 \times 19.00$ خلية / مل، وفي الأسبوع الثالث $10^4 \times 23.33$ خلية / مل، وتصل إلى أعلى قيمة لها $10^4 \times 26.33$ خلية / مل في الأسبوع الرابع، أما عند استخدام المصفاة ذات القطر 450 ميكرون فقد بلغت الكثافة الخلوية أعلى قيمة لها 23.00 $10^4 \times$ خلية / مل في الأسبوع الرابع، بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين الذكورتين. تبين نتائج الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين المعلقات الخلوية المزروعة بدءاً من الأوراق والسلاميات ضمن الصنف تشالنجر، حيث كانت المتوسطات متساوية معنوياً في الأسبوع الرابع 25.50 $10^4 \times$ خلية / مل لمعلقات الأوراق و $10^4 \times 24.67$ خلية / مل لمعلقات السلاميات.

وعند مقارنة الكثافة الخلوية للمعلقات للصنفين أمارين وتشالنجر، فقد أظهرت نتائج الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين الصنفين المدروسين، حيث وصلت المعلقات الخلوية للصنف تشالنجر مرحلة الثبات في الأسبوع الثاني وبمتوسط $10^4 \times 17.17$ خلية / مل لتبلغ $10^4 \times 20.33$ خلية / مل

في الأسبوع الثالث، ولتصل أقصاها في الأسبوع الرابع 25.08×10^4 خلية / مل، في حين بلغت المعلقات الخلوية للصنف أمارين مرحلة الثبات في الأسبوع الثالث بمتوسط كثافة 17.75×10^4 خلية / مل، لتصل أعلى قيمة لها 18.58×10^4 خلية / مل في الأسبوع الرابع، وتعزى مثل هذه الفروق بين الصنفين إلى الاختلاف في التركيب الوراثي (Vasil و Vasil، 1986).



الشكل رقم (12) زرع المعلقات الخلوية: A- خلايا مستمدة من أوراق أمارين، B- خلايا مستمدة من سلاميات أمارين، C - خلايا مستمدة من أوراق تشالنجر، D- خلايا مستمدة من سلاميات تشالنجر.

الجدول رقم (10): تأثير مصدر وقطر الخزعة النباتية في الكثافة الخلوية في المعلقات الخلوية في صنف البطاطا المدروسين

جدول الكثافة الخلوية ($10^4 \times$ خلية / مل) في المعلقات الخلوية								
الصنف								الأسبوع
تشالنجر				أمارين				
سلاميات		أوراق		سلاميات		أوراق		
450 μm	250 μm	450 μm	250 μm	450 μm	250 μm	450 μm	250 μm	
13.33 ^c	16.33 ^c	13.33 ^d	14.33 ^{cd}	6.00 ^d	6.67 ^d	6.00 ^d	5.67 ^d	1
15.00 ^c	19.00 ^{bc}	15.00 ^{bcd}	19.67 ^{bcd}	9.33 ^{cd}	8.33 ^{cd}	8.33 ^{cd}	7.67 ^{cd}	2
17.00 ^c	23.33 ^{ab}	19.67 ^{abc}	21.33 ^{abc}	23.67 ^a	14.00 ^{abc}	12.67 ^{bc}	20.67 ^a	3
23.00 ^{ab}	26.33 ^a	28.33 ^a	22.67 ^{ab}	21.67 ^{ab}	16.33 ^{abc}	15.33 ^b	21.00 ^a	4
5.74		7.74		8.76		5.33		LSD _{0.01}
متوسطات								الأسبوع
تشالنجر		أمارين		تشالنجر		أمارين		
				سلاميات	أوراق	سلاميات	أوراق	
14.33 ^c		6.08 ^d		14.83 ^d	13.83 ^d	6.33 ^b	5.83 ^b	
17.17 ^{bc}		8.42 ^d		17.00 ^{cd}	17.33 ^{cd}	8.83 ^b	8.00 ^b	2
20.33 ^b		17.75 ^{bc}		20.17 ^{bc}	20.50 ^{abc}	18.33 ^a	16.67 ^a	3
25.08 ^a		18.58 ^b		24.67 ^{ab}	25.50 ^a	19.00 ^a	18.17 ^a	4
3.82				5.31		6.18		LSD _{0.01}
*يشير اختلاف الأحرف إلى الفروق المعنوية بين التراكيز ضمن الصنف الواحد عند مستوى ثقة 99%								

4-3-2 معدل الانقسام الخلوي:

لقد تم الحصول على منحنيات النمو للمعلقات المدروسة الشكل (13، 14) بما يوافق حركية النمو في المعلقات الخلوية، إذ بلغت مرحلة الثبات في الأسبوع الثالث، وهذا يوافق نتائج (Anjum، 1994؛ Tang وزملاؤه، 2001).

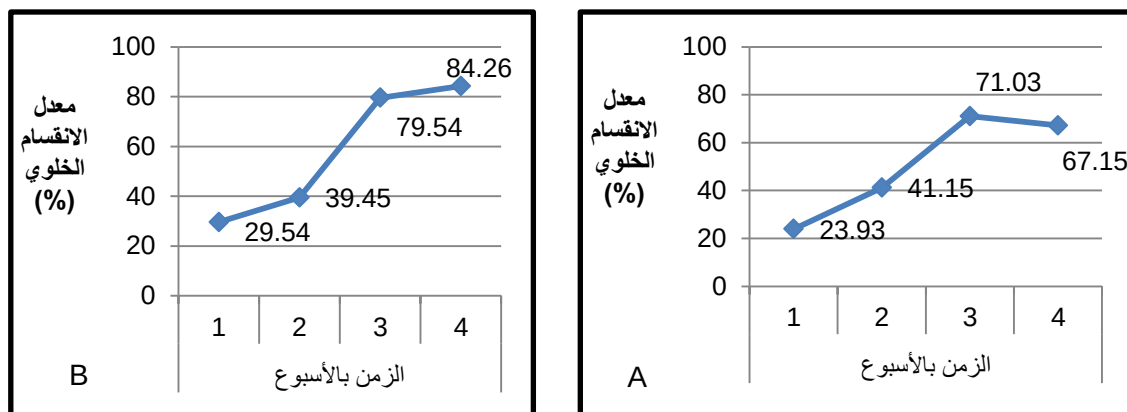
4-3-2-1 معدل الانقسام الخلوي لمعلقات الصنف أمارين:

- بدءاً من خلايا الأوراق: بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين المعلقات الخلوية المزروعة باستخدام مصفاة ذو قطر 250 ميكرون و 450 ميكرون مع تفوق القطر 250 ميكرون، حيث بلغت المعلقات مرحلة الثبات عند معدل انقسام خلوي 69.33% في الأسبوع الثالث واستمرت في الانقسام لتصل إلى أعلى قيمة لها 71.56% في الأسبوع الرابع، أما عند استخدام المصفاة ذو قطر 450 ميكرون بلغت المعلقات معدل الانقسام في الأسبوع الثالث أعلى قيمة لها 72.73% لينخفض مع وجود فروق معنوية إلى 62.73% في الأسبوع الرابع، وقد يعزى ذلك إلى تماوت خلايا المعلقات نتيجة تنافسها على مكونات وسط الزرع.

- بدءاً من خلايا السلاميات: أظهرت المعلقات الخلوية المزروعة باستخدام المصفاة المعدنية بقطر 250 ميكرون و 450 ميكرون تماثلاً في معدلات الانقسام الخلوي مع عدم وجود فروق معنوية، حيث وصلت مرحلة الثبات في الأسبوع الثالث من الزرع وبمعدل انقسام 75.92% عند استخدام القطر 250 ميكرون، 83.10% عند استخدام القطر 450 ميكرون وتبلغ أعلى معدل انقسام 79.46% و 89.06% على التوالي.

بينت الدراسة الإحصائية تفوق معلقات السلاميات بالمقارنة مع معلقات الأوراق للصنف أمارين لصفة معدل الانقسام الخلوي مع عدم وجود فروق معنوية في الأسبوع الثالث (مرحلة الثبات)، إذ بلغت معلقات الأوراق مرحلة الثبات بمعدل انقسام 71.03% في الأسبوع الثالث لتتخفض إلى 67.15% في الأسبوع

الرابع، في حين بلغت معلقات السلامة مرحلة الثبات بمعدل انقسام 79.54% في الأسبوع الثالث واستمرت بالانقسام لتبلغ أعلى متوسط لها في الأسبوع الرابع 84.26%.



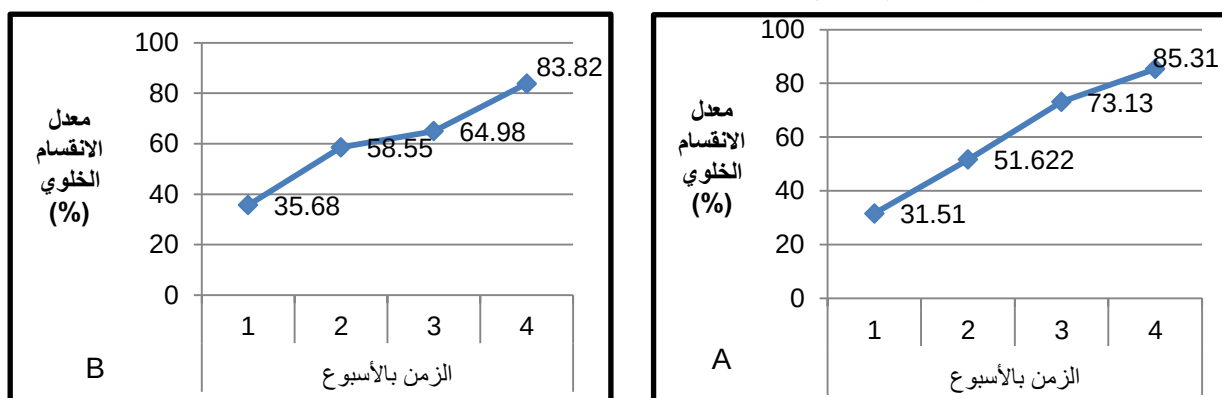
الشكل رقم (13) منحنى النمو في المعلقات الخلوية :
A- أوراق الصنف أمارين ، B- سلاميات الصنف أمارين.

4-2-2 معدل الانقسام الخلوي لمعلقات الصنف تشالنجر:

- بدءاً من الأوراق: بلغت المعلقات الخلوية المستمدة من أوراق الصنف تشالنجر مرحلة الثبات في الأسبوع الثالث من الزرع وبمعدل انقسام خلوي 74.95% عند استخدام مصفاية ذات قطر 250 ميكرون، و 71.30% عند استخدام مصفاية ذات قطر 450 ميكرون مع عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين، واستمرت المعلقات بالانقسام لتصل أعلى قيمة معنوياً لها في الأسبوع الرابع 85.32% و 85.31% لكلا المعاملتين على التوالي.

- بدءاً من السلامة: أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين معلقات سلاميات الصنف تشالنجر لصقة % معدل الانقسام الخلوي عند استخدام المصفايتين 250 ميكرون و 450 ميكرون، حيث وصلت مرحلة الثبات في الأسبوع الثاني وبمعدل انقسام 59.54% و 57.56% لكلا المعاملتين على التوالي، واستمرت الخلايا بالانقسام وبمعدل 63.33% و 66.60% في الأسبوع الثالث على التوالي، ووصلت أعلى قيمة لها في الأسبوع الرابع 89.58% و 78.06%.

تبين نتائج في الجدول رقم (11) عدم وجود فروق معنوية بين معلقات الأوراق ومعلقات السلاميات للصنف تشالنجر لصفة معدل الانقسام الخلوي، حيث بلغت معلقات الأوراق مرحلة الثبات في الأسبوع الثاني بمتوسط لمعدل الانقسام 51.62% واستمرت الخلايا بالانقسام ليبلغ المتوسط 75.13% في الأسبوع الثالث وأقصى متوسط 85.31% في الأسبوع الرابع، في حين بلغت معلقات السلاميات مرحلة الثبات في الأسبوع الثاني بمتوسط لمعدل انقسام 58.55% وفي الأسبوع الثالث 64.98% ويبلغ أقصاها 83.82% في الأسبوع الرابع.



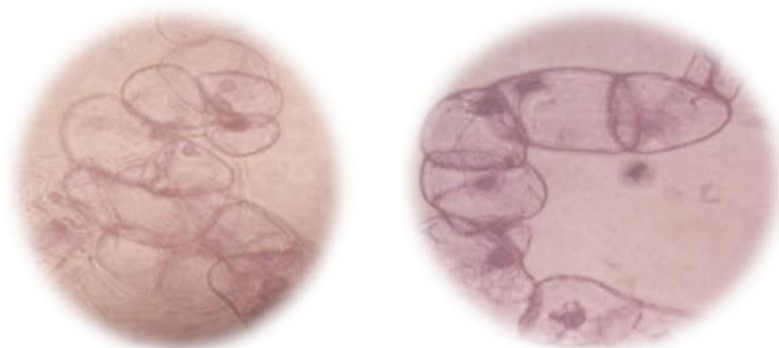
الشكل رقم (14) منحنى النمو في المعلقات الخلوية :

A- أوراق الصنف تشالنجر، B-سلاميات الصنف تشالنجر.

أظهرت نتائج المقارنة لصفة معدل الانقسام بين الصنفين في الجدول رقم (11) تفوق معلقات تشالنجر على معلقات أمارين مع عدم وجود فروق معنوية، حيث بلغت معلقات تشالنجر مرحلة الثبات في الأسبوع الثاني من الزرع وبمتوسط معدل انقسام 55.08% وفي الأسبوع الثالث 69.05% ليبلغ أقصاها في الأسبوع الرابع 84.5%، في حين وصلت معلقات الصنف أمارين مرحلة الثبات في الأسبوع الثالث بمتوسط 75.29% وأقصى معدل للانقسام في الأسبوع الرابع 75.7%، الشكل رقم (15) ، وقد تعزى مثل هذه الفروق في معدلات الانقسام الخلوي إلى التباينات الوراثية بين الصنفين (Vasil و Vasil، 1986).

الجدول رقم (11) : تأثير معدل الانقسام الخلوي في المعلقات الخلوية للخزعات النباتية في صنف البطاطا المدروسين

الصنف								الأسبوع
تشانجر				أمارين				
سلاميات		أوراق		سلاميات		أوراق		
450 µm	250 µm	450 µm	250 µm	450 µm	250 µm	450 µm	250 µm	
32.79 ^d	38.56 ^d	30.23 ^d	32.79 ^d	24.17 ^b	34.92 ^b	24.52 ^d	23.33 ^d	1
57.56 ^c	59.54 ^c	42.16 ^d	61.08 ^c	28.97 ^b	35.92 ^b	49.87 ^{cd}	38.42 ^{bc}	2
66.60 ^{bc}	63.36 ^c	71.30 ^{bc}	74.95 ^{ab}	83.16 ^a	75.92 ^a	72.73 ^a	69.33 ^a	3
78.06 ^{ab}	89.58 ^a	85.31 ^a	85.32 ^a	89.06 ^a	79.46 ^a	62.73 ^{ab}	71.56 ^a	4
11.71		13.49		15.90		16.47		LSD _{0.01}
متوسطات								الأسبوع
تشانجر		أمارين		تشانجر		أمارين		
				سلاميات	أوراق	سلاميات	أوراق	
33.59 ^{de}		26.73 ^e		35.68 ^e	31.51 ^e	29.54 ^e	23.93 ^e	
55.08 ^c		38.28 ^d		58.55 ^{cd}	51.62 ^d	32.45 ^{de}	44.15 ^d	2
69.05 ^b		75.29 ^b		64.98 ^{bc}	73.13 ^b	79.54 ^{ab}	71.03 ^{bc}	3
84.50 ^a		75.70 ^{ab}		83.82 ^a	85.31 ^a	84.26 ^a	67.15 ^c	4
8.88				10.28		11.75		LSD _{0.01}
*يشير اختلاف الأحرف إلى الفروق المعنوية بين التراكيز ضمن الصنف الواحد عند مستوى ثقة 99%								



الشكل رقم (15) الإنقسام الخلوي في المعلقات الخلوية تحت المجهر الضوئي المقلوب تكبير 20×

4-3-3 اختبار TTC لحيوية الخلايا:

كانت حيوية الخلايا منخفضة نسبياً في الصنفين في الأسبوعين الأول والثاني من زراعة المعلقات الخلوية، وبدأت بالتزايد وبشكل ملحوظ في الأسبوع الثالث لتستقر في الأسبوع الرابع وهذا يوافق حركية نمو الخلايا في المعلقات (Street، 1977).

4-3-3-1 حيوية المعلقات الخلوية للصنف أمارين:

- بدءاً من الأوراق: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول رقم (12) وجود فروق معنوية بين المعلقات الخلوية عند استخدام مصفاتي معدنيتين بقطر 250 ميكرون و 450 ميكرون لصفة حيوية الخلايا، والتي تم التعبير عنها بقراءة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 485 nm وفق اختبار TTC، حيث تفوقت معنوياً المعلقات الخلوية عند استخدام مصفاة بقطر 250 ميكرون ولتبلغ أعلى قيمة لها في الأسبوعين الثالث والرابع وقراءة امتصاصية 0.445، 0.456 على التوالي، أما عند استخدام مصفاة بقطر 450 ميكرون كانت قراءة الامتصاصية أعلاها في الأسبوعين الثالث والرابع 0.165 و0.128 على التوالي.

- بدءاً من السلامة: وبشكل مغاير لمعلقات الأوراق أظهرت النتائج تفوق معنوي للمعلقات عند استخدام مصفاة بقطر 450 ميكرون حيث بلغت أعلى قيمة للامتصاصية في الأسبوعين الثالث والرابع 0.489 و 0.458 على التوالي، في حين كانت أعلى قراءة للامتصاصية عند استخدام مصفاة بقطر 250 ميكرون في الأسبوعين الثالث والرابع 0.090 و 0.074 على التوالي.

ولدى مقارنة حيوية المعلقات الأوراق والسلاميات للصنف أمارين، بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين حيوية المعلقات الخلوية، ففي الأسبوعين الأول والثاني كانت حيوية الخلايا منخفضة بدليل قراءة الامتصاصية المنخفضة وقد يعزى ذلك لتوجه الخلايا في هذه المرحلة للاستفادة من مكونات الوسط المغذي تمهيداً لدخولها مرحلة الانقسام الميتوزي، لترتفع حيوية الخلايا لاحقاً مع دخول المعلقات الخلوية

في طور الثبات (الأسبوع الثالث) حيث كانت قراءة الامتصاصية 0.305 لمعلقات الأوراق و 0.289 لمعلقات السلاميات، ومع دخول المعلقات الأسبوع الرابع انخفضت قراءة الامتصاصية لتصبح 0.292 لمعلقات الأوراق و 0.266 لمعلقات السلاميات، مما يدل على انخفاض حيوية الخلايا والذي يعزى لتمامها نتيجة تنافسها على مكونات الوسط المغذي.

4-3-3-2 حيوية المعلقات الخلوية للصنف تشالنجر:

• بدءاً من الأوراق: بينت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول رقم (12) عدم وجود فروق معنوية بين المعلقات الخلوية المستمدة من أوراق الصنف تشالنجر عند استخدام مصفاة بقطر 450 ميكرون لصفة حيوية الخلايا (قراءة الامتصاصية في الأسبوع الرابع 0.143) مقارنة مع المعلقات المزروعة باستخدام مصفاة بقطر 250 ميكرون (قراءة الامتصاصية في الأسبوع الرابع 0.089)، يذكر أنه لا توجد فروق معنوية بين المعاملتين عند وصول المعلقات للأسبوع الثالث 0.077 (مصفاة بقطر 250 ميكرون) و 0.074 (مصفاة بقطر 450 ميكرون)، وقد يعزى استمرار الزيادة في قراءة الامتصاصية وبالتالي في حيوية الخلايا مع وصولها للأسبوع الرابع إلى معدلات الانقسام المرتفعة في هذا الأسبوع.

• بدءاً من السلاميات: أظهرت النتائج تفوق المعلقات المزروعة بمصفاة ذات قطر 250 ميكرون وبفروق معنوية مقارنة مع المعلقات المزروعة بمصفاة ذات قطر 450 ميكرون، وذلك خلال الأسبوعين الثالث والرابع حيث كانت قراءة الامتصاصية (0.108، 0.227) على التوالي عند استخدام مصفاة بقطر 250 ميكرون، (0.075، 0.100) على التوالي عند استخدام مصفاة بقطر 450 ميكرون، وقد تعزى هذه الفروق المعنوية لمعدلات الانقسام والكثافة الخلوية المرتفعة للمعلقات الخلوية مع دخولها مرحلة الثبات.

تماثلت معلقات الأوراق مع معلقات السلاميات للصنف تشالنجر لصفة حيوية الخلايا مع عدم وجود فروق معنوية في قراءة الامتصاصية خلال الأسابيع الثلاث الأولى من الزرع، حيث بلغت في الأسبوع

الثالث 0.075 لمعلقات الأوراق، و 0.092 لمعلقات السلاميات، ومع وصولها للأسبوع الرابع تفوقت
معلقات السلاميات معنوياً لصفة حيوية الخلايا (قراءة الامتصاصية 0.164) مقارنة مع معلقات الأوراق
(قراءة الامتصاصية 0.116).

أظهرت النتائج أن حيوية الخلايا كانت منخفضة لمعلقات الصنفين أمارين وتشالنجر خلال الأسبوعين
الأول والثاني بغض النظر عن مصدر الخزعة النباتية (الأوراق، السلاميات) وقطر المصفاة المعدنية
(250 ميكرون، 450 ميكرون)، وقد يعزى ذلك إلى الكثافة الخلوية المنخفضة نسبياً نتيجة توجه الخلايا
للاستفادة من مكونات الوسط المغذي وتكوين الجزيئات الخلوية اللازمة للانقسام الخلوي، ومع وصول
المعلقات الخلوية لطور الثبات في الأسبوع الثالث تفوقت معلقات الصنف أمارين وبفارق معنوي لصفة
حيوية الخلايا (قراءة الامتصاصية للأسبوعين الثالث والرابع على التوالي 0.297 و 0.279) مقارنة مع
معلقات الصنف تشالنجر (قراءة الامتصاصية للأسبوعين الثالث والرابع على التوالي 0.083 و 0.140)
وقد تعزى هذه الفروق لطبيعة الصنف واستجابته للزرع في أوساط السائلة.

الجدول رقم (12): تأثير مصدر وقطر الخزعة النباتية في حيوية خلايا المعلقات الخلوية في صنفي البطاطا المدروسين

الصنف								الأسبوع	
تشانجر				أمارين					
سلاميات		أوراق		سلاميات		أوراق			
450 µm	250 µm	450 µm	250 µm	450 µm	250 µm	450 µm	250 µm		
0.020 ^g	0.060 ^e	0.020 ^f	0.020 ^f	0.010 ^g	0.010 ^f	0.010 ^{ef}	0.006 ^f	1	
0.040 ^f	0.080 ^d	0.030 ^e	0.060 ^d	0.010 ^f	0.020 ^e	0.020 ^e	0.010 ^{ef}	2	
0.070 ^d	0.110 ^b	0.074 ^c	0.077 ^c	0.490 ^a	0.090 ^c	0.160 ^c	0.440 ^b	3	
0.100 ^c	0.230 ^a	0.140 ^a	0.090 ^b	0.460 ^b	0.070 ^d	0.130 ^d	0.460 ^a	4	
0.006		0.005		0.005		0.006		LSD _{0.01}	
متوسطات								الأسبوع	
تشانجر		أمارين		تشانجر		أمارين			
				سلاميات	أوراق	سلاميات	أوراق		
0.032 ^c		0.015 ^c		0.041 ^{de}	0.023 ^e	0.010 ^b	0.009 ^b		1
0.052 ^{bc}		0.010 ^c		0.058 ^{cde}	0.045 ^{de}	0.017 ^b	0.013 ^b		2
0.083 ^{bc}		0.297 ^b		0.092 ^{bc}	0.075 ^{bcd}	0.289 ^a	0.305 ^a		3
0.140 ^b		0.279 ^a		0.164 ^a	0.116 ^b	0.266 ^a	0.292 ^a	4	
0.102				0.046		0.212		LSD _{0.01}	
*يشير اختلاف الأحرف إلى الفروق المعنوية بين التراكيز ضمن الصنف الواحد عند مستوى ثقة 99%									

4-4 تجديد المعلقات الخلوية Regeneration Stage suspension :

إن عملية التشكل والتجديد هي عملية معقدة تتأثر بعدة عوامل داخلية وخارجية ذات تأثيرات تراكمية (Delport وزملاؤه، 2014)، وذكر SKoog و Miller (1957) أنه للتحكم في تجديد النبات من الكالس لابد من إضافة كميات متوازنة من الأوكسين والسيتوكينين بحيث تكون نسبة السيتوكينين/الأوكسين أكبر من الواحد.

1-4-4 تجديد المعلقات الخلوية بتأثير السيتوكينين BAP:

1-1-4-4 الصنف أمارين:

1-1-1-4-4 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق:

كان التركيز الأمثل 1.75 مغ/ل من السيتوكينين BAP حيث أعطى أعلى قيمة معنوية (90%) لصفة النسبة المئوية لتجديد الكالس العضوي المتكون من معلقات أوراق الصنف أمارين بالمقارنة مع التراكيز الأخرى المستخدمة ، مع عدم وجود فروق معنوية عند استخدام التركيز 1مغ/ل، ولكن تفوق عليه من حيث درجة تجديد الكالس العضوي، لم تسجل استجابة ايجابية مع غياب BAP في وسط التجديد الجدول رقم (13).

2-1-1-4-4 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة:

بينت النتائج في الجدول رقم (13) إلى عدم وجود فروق معنوية بين معاملات السيتوكينين BAP لصفة النسبة المئوية لتجديد الكالس العضوي حيث بلغت نسبة التجديد 73,33% عند استخدام التركيز 1مغ/ل، وبلغت نسبة التجديد 95% عند استخدام التركيز 1,75مغ/ل في حين انخفضت النسبة عند التركيز 5مغ/ل إلى 90% مع تفوق التركيز 1,75 من حيث درجة تجديد وبشكل مشابه للأوراق لم تلاحظ استجابة ايجابية عند غياب السيتوكينين BAP في وسط التجديد .

بينت نتائج الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية في النسبة المئوية للكالس العضوي بين معلقات الأوراق والسلاميات عند الصنف أمارين حيث كان استخدام التركيز الأمثل 1.75 مغ/ل من السيتوكينين BAP في النسبة المئوية للكالس العضوي المتكون من المعلقات بقيمة بلغت 95% للأوراق والسلاميات الشكل رقم (16).

4-4-1-2 الصنف تشالنجر:

4-4-1-2-1 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق:

بينت النتائج في الجدول رقم (13) تفوق التركيز 1,75مغ/ل BAP حيث بلغت نسبة الكالس العضوي المتكون من المعلقات 93,33% ، مع عدم وجود فروق معنوية مقارنة مع بقية المعاملات، في حين بلغت أقل نسبة للكالس العضوي بقيمة تراوحت بين 60%_72% عند استخدام التركيز 1_5مغ/ل من السيتوكينين BAP على التوالي ، وكانت الإستجابة سلبية للكالس العضوي بغياب السيتوكينين BAP في الوسط المغذي.

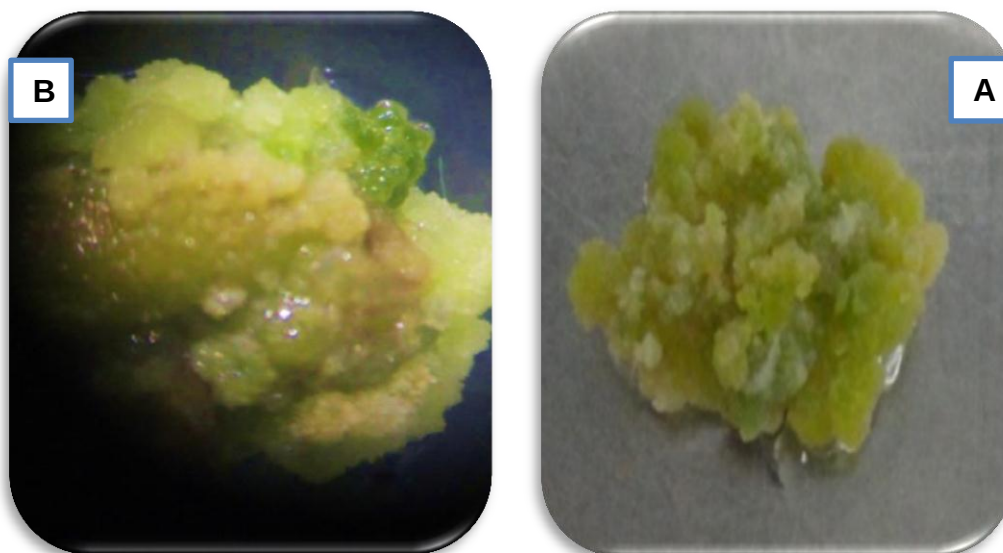
4-4-1-2-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلاميات:

بينت نتائج الدراسة الإحصائية أن تجديد معلقات سلاميات الصنف تشالنجر كانت مماثلة للأوراق إذ تفوق التركيز 1,75مغ/ل BAP بالنسبة للكالس العضوي بقيمة بلغت 95% مع عدم وجود فروق معنوية مقارنة مع المعاملات الأخرى، في حين بلغت النسبة المئوية للكالس العضوي 51,66%، 60% عند استخدام التركيز 1مغ/ل، 5مغ/ل على التوالي، في حين انعدمت النسبة المئوية للكالس العضوي بغياب السيتوكينين BAP من الوسط المغذي.

بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية في الكالس العضوي المتكون من معلقات أوراق وسلاميات الصنف تشالنجر، حيث كان استخدام التركيز 1,75مغ/ل من BAP الأمثل في النسبة المئوية للكالس العضوي بقيمة بلغت 93.33% من معلقات الأوراق، 95% من معلقات السلاميات الشكل رقم (16).

لم يلاحظ اختلاف بين الصنفين المدروسين أمارين وتشالنجر في النسبة المئوية للكالس العضوي المتكون من المعلقات بتأثير السيتوكينين BAP في وسط التجديد، إذ إن تأثير BAP متماثل على كلا الصنفين ولكلا الخزعتين (الأوراق والسلاميات) وكان التركيز الأمثل من السيتوكينين المستخدم BAP 1,75مغ/ل.

إن منظم النمو BAP يلعب دوراً مهماً وأساسياً في تأثيره على تجديد الكالس العضوي المتكون من المعلقات ، ويليهما مرحلة تشكل الأعضاء النباتية في البطاطا حيث يؤدي إلى تحسن كبير في تجديد البراعم عند استخدامها بتركيز معتدلة (Kumar وزملاؤه، 2014).



الشكل رقم (16): الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية على وسط يحوي BAP

A- الصنف تشالنجر B- الصنف أمارين

الجدول رقم (13): تأثير تركيز السيتوكينين BAP على الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لصنف البطاطا المدروسين

الخزعة النباتية	تركيز BAP (مغ/ل)	الصنف					
		أمارين			تشانجر		
		الكالس العضوي (%)	درجة تشكل الكالس العضوي	لون الكالس العضوي	الكالس ا الكالس العضوي (%)	درجة تشكل الكالس العضوي	لون الكالس العضوي
الأوراق	0	0 ^c	+	كريمي	0 ^b	++	كريمي
	1	86.67 ^{ab}	++	أخضر فاتح	60 ^a	+++	أخضر كريمي
	1.75	90 ^a	++++	أخضر فاتح	93.33 ^a	++++	أخضر
	2.5	68.33 ^b	+++	أخضر فاتح	80 ^a	++++	أخضر
	5	70 ^b	++	أخضر فاتح	72 ^a	+++	أخضر كريمي
	المتوسط	64 ^A			61.07 ^A		
	LSD _{0.01}	24.269			37.248		
السلاميات	0	0 ^b	+	أخضر كريمي	0 ^b	++	أخضر فاتح
	1	73.33 ^a	+++	أخضر فاتح	51.66 ^a	+++	أخضر
	1.75	95 ^a	++++	أخضر فاتح	95 ^a	++++	أخضر
	2.5	80 ^a	++	أخضر فاتح	60.67 ^a	++++	أخضر كريمي
	5	90 ^a	+++	أخضر فاتح	60 ^a	++	أخضر كريمي
	المتوسط	67.66 ^A			54.66 ^A		
	LSD _{0.01}	31.456			46.077		
للصنف		26.703			39.821		
للتفاعل بين الأصناف		33.078					
والتراكيز		LSD _{0.01}					

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

4-4-2 تجديد المعلقات الخلوية بتأثير السيوكينين الزياتين Z:

4-4-2-1 الصنف أمارين:

4-4-2-1-1 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق:

تفوق التركيز 1,5مغ/ل من السيوكينين Z معنوياً على المعاملات الأخرى حيث بلغت نسبة الكالس

العضوي 90% ، مع عدم وجود فروق معنوية مع التركيز 0,75 مغ/ل، 2مغ/ل ، حيث كانت نسبة

الكالس العضوي 78,33% و 71,67% على التوالي ، بينما بلغت نسبة الكالس العضوي 49% عند

التركيز 0.5 مغ/ل في حين انعدمت النسبة المئوية للتجديد في الشاهد بغياب السيتوكينين الزياتين Z من الوسط المغذي.

4-4-2-1-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلاميات:

بينت النتائج في الجدول رقم (14) أن التركيز الأمثل لتجديد الكالس العضوي المتكون من معلقات السلاميات من الصنف أمارين كان 1.5 مغ/ل بقيمة بلغت (75%)، مع عدم وجود فروق معنوية في المعاملات الأخرى 2-1-0,75 (53%، 56,66%، 58,33%) على التوالي، وكانت أقل نسبة للكالس العضوي 27,99% عند استخدام التركيز 0,5 مغ/ل، في حين انعدمت النسبة المئوية للكالس العضوي في الشاهد بغياب السيتوكينين الزياتين Z من الوسط المغذي.

كما بينت النتائج تفوق معلقات السلاميات من الصنف أمارين بالنسبة للكالس العضوي بتأثير السيتوكينين الزياتين الـ Z، حيث كان استخدام التركيز 1,5 مغ/ل لكل من الأوراق والسلاميات هو التركيز الأمثل للتجديد، بقيمة بلغت 90% من معلقات الأوراق، 75% من معلقات السلاميات.

4-4-2-2-4 الصنف تشالنجر:

4-4-2-2-4-1 الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق:

كما بينت النتائج في الجدول رقم (14) تفوق التركيز 1,5 مغ/ل من السيتوكينين الزياتين معنوياً على التراكيز الأخرى للنسبة المئوية للكالس العضوي بقيمة 83,33%، مع عدم وجود فرق معنوية عند استخدام التراكيز 1 و 2 مغ/ل حيث كانت النسبة المئوية للكالس العضوي (65,33%-78,33%) على التوالي، بينما بلغت النسبة المئوية للكالس العضوي 43% عند استخدام التركيز 0,5 مغ/ل، في حين انعدمت النسبة المئوية للكالس العضوي للشاهد بغياب السيتوكينين الزياتين Z من الوسط المغذي.

4-2-2-2 الكالس العضوي المتكون من معلقات السلاميات:

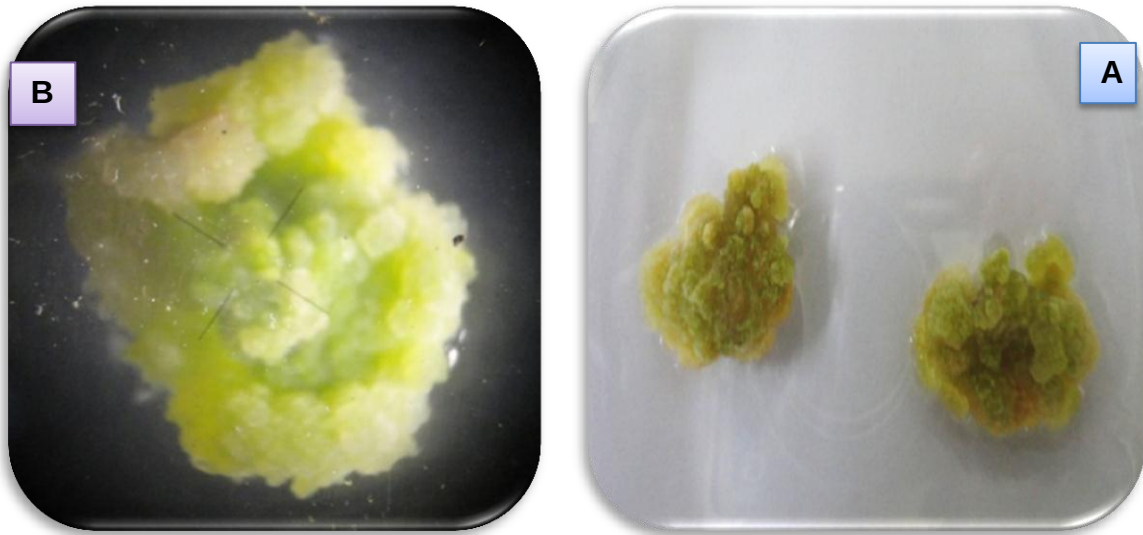
لم تظهر معلقات السلاميات من الصنف تشالنجر أية فروق معنوية فيما بينها عند استخدام الزيائين كمعرض لتجديد الكالس العضوي من المعلقات الخلوية ، حيث تفوق التركيز 0.5 مغ/ل معنوياً للنسبة المئوية للكالس العضوي بقيمة 70% ، في حين بلغت النسبة المئوية للكالس العضوي 52%، 53,33% عند استخدام التركيزين 1.5 و 1 مغ/ل على التوالي، في حين انعدمت النسبة المئوية للكالس العضوي للشاهد بغياب السيتوكينين الزيائين Z من الوسط المغذي.

كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول رقم (14) ، تفوق معلقات الأوراق من الصنف تشالنجر معنوياً على معلقات السلاميات بوجود السيتوكينين الزيائين في وسط التجديد، حيث كان استخدام التركيز 1.5 مغ/ل الأمثل بالنسبة للكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق بقيمة بلغت 83,33%، في حين كان استخدام التركيز 0.5 مغ/ل الأمثل بالنسبة للكالس العضوي المتكون من معلقات السلاميات بنسبة بلغت 70%.

كما بينت النتائج في الجدول رقم (14) بأن استخدام السيتوكينين الزيائين Z كمعرض لتجديد الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية، تفوقت معلقات الأوراق على السلاميات معنوياً بالنسبة للكالس العضوي ، حيث كان استخدام التركيز 1.5 مغ/ل الأمثل للتجديد من معلقات الأوراق والسلاميات للصنف أمارين بنسبة بلغت (90%، 75%) على التوالي، بينما بلغت نسبة التجديد من معلقات الأوراق من الصنف تشالنجر (83.33%) الجدول رقم (14)، وهذا يوافق نتائج القباني (2013) حيث بلغت النسبة المئوية للتجديد 81.25% عند استخدام التركيز 1.5 مغ/ل من السيتوكينين Z لتجديد الكاس من بروتوبلاست الصنف بنيلا، في حين كان استخدام التركيز 0.5 مغ/ل Z الأمثل بالنسبة للكالس العضوي المتكون من معلقات السلاميات للصنف تشالنجر بقيمة بلغت (70%)، وهذا يوافق Thomas (1981)

عند تجديد بروتوبلاست الصنف Maris Bard حيث بلغت النسبة 50% عند استخدامه لتركيز 0.5 مغ/ل Z.

كما تميز الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية عند تجديده على الوسط MS المغذي مضافاً له Z الزيائتين بتباين لونه بين الأخضر الكريمي والأخضر الكريمي المسمر مترافقاً بزيادة تركيز السيتوكينين المضاف، كما أن التجديد من معلقات الأوراق ولكلا الصنفين ازدادت مع ازدياد تركيز Z الزيائتين في وسط التجديد الشكل (17) ، في حين كانت استجابة السلامة للتجديد ضعيفة، الجدول رقم (14).



الشكل رقم (17): الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية على وسط يحوي الزيائتين Z

A- الصنف شالنجر B- الصنف أمارين

الجدول رقم (14): تأثير تركيز السيتوكينين الزياتين Z على الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لصنفي البطاطا المدروسين

الخزعة النباتية	تركيز Z (مغ/ل)	الصنف			
		أمارين		تشانجر	
		الكالس العضوي (%)	درجة تشكل الكالس العضوي	لون الكالس العضوي	الكالس العضوي (%)
الأوراق	0	0 ^d	-	كريمي	0 ^d
	0.5	49 ^c	+	أخضر كريمي مسمر	43 ^c
	0.75	71.67 ^{ab}	+++	أخضر كريمي مسمر	58.67 ^{bc}
	1	68.33 ^{bc}	++	أخضر كريمي مسمر	65.33 ^{abc}
	1.5	90 ^a	++++	أخضر كريمي	83.33 ^a
	2	78.33 ^{ab}	++++	أخضر كريمي مسمر	78.33 ^{ab}
	المتوسط	59.55 ^A			54.77 ^A
	LSD _{0.01}	23.616			24.284
	0	0 ^c	+	كريمي	0 ^b
	0.5	27.99 ^{bc}	+	أخضر كريمي	70 ^a
السلاميات	0.75	53 ^{ab}	+++	أخضر كريمي مسمر	57.33 ^a
	1	56.66 ^{ab}	++	أخضر كريمي مسمر	52 ^a
	1.5	75 ^a	+++	أخضر كريمي مسمر	53.33 ^a
	2	58.33 ^{ab}	++	أخضر كريمي مسمر	63.67 ^a
	المتوسط	45.16 ^A			49.38 ^A
	LSD _{0.01}	34.329			27.176
	للسنف	27.378			24.714
	للتفاعل بين الأصناف				
	والتراكيز				
					25.553

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

تبين النتائج في الجدول (15) تفوق تأثير السيتوكينين BAP على Z في تجديد المعلقات الخلوية مع عدم وجود فروق معنوية بينهما في النسبة المئوية للكالس العضوي ، وذلك عند تجديد المعلقات الخلوية للصنفين المدروسين أمارين وتشالنجر وبين الخزعات النباتية (الأوراق، والسلاميات)، فقد بلغ متوسط النسبة المئوية للكالس العضوي (61.85 %) بتأثير BAP و(52.22 %) بتأثير Z، كما لم يسجل الصنفان استجابة إيجابية بغياب السيتوكينيات المستخدمة في أوساط التجديد.

جدول رقم (15): تأثير منظمات النمو النباتية BAP و Z على النسبة المئوية للكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لصنفي البطاطا المدروسين

متوسط الصنفين	الصنف						منظمات النمو
	تشالنجر			أمارين			
	المتوسط	السلاميات	الأوراق	المتوسط	السلاميات	الأوراق	
61.85 ^A	57.86 ^a	54.66 ^a	61.07 ^a	65.83 ^a	67.66 ^a	64 ^a	BAP
52.22 ^A	52.08 ^a	49.39 ^a	54.78 ^a	52.36 ^a	45.16 ^a	59.55 ^a	Z
11.891	16.806	23.994	24.748	17.178	24.872	24.453	LSD_{0.0} 1%

*يشير اختلاف الأحرف الصغيرة إلى الفروق المعنوية بين المعاملات ضمن الصنف الواحد، ويشير اختلاف الأحرف الكبيرة إلى الفروق المعنوية بين الأصناف عند مستوى ثقة 99%.

4-5 دراسة التغيرات الوراثية Genetic variations Studing :

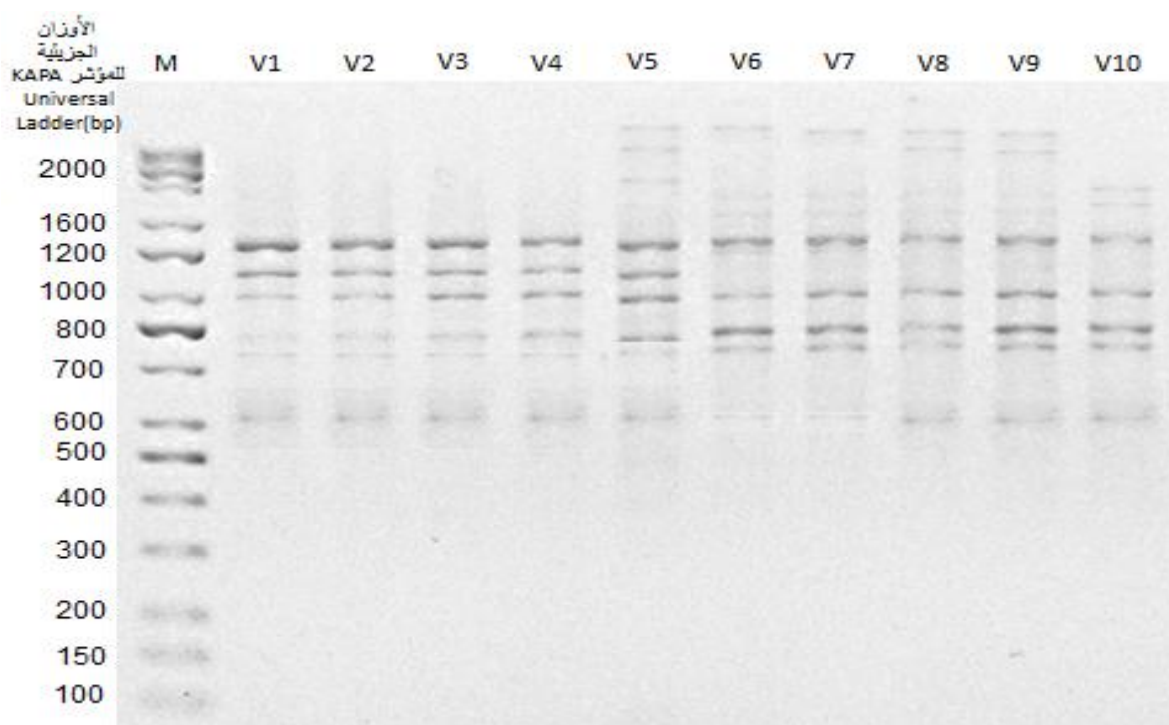
تم تنفيذ الدراسة الجزيئية على مستوى DNA للعينات المدروسة من صنفين البطاطا أمارين وتشالنجر، بإجراء اختبار ISSR وباستخدام 17 مرئسة ثم تم ترحيل نواتج تضخيم تفاعل PCR على هلامه أغاروز بتركيز (2%) وبوجود صبغة إيثيديوم برومايد ومقارنتها مع معلم Marker ماركة KAPA التجارية وذو وزن جزيئي (2000 pb)، وتم الحصول النتائج التالية:

المرئسة Pr1:

⊕ أعطت المرئسة Pr1 9 حزم في عينة النبات الأم للصنف أمارين بأوزان تراوحت بين (600 و 2400 pb) ، و 6 حزم في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات وعلى وسطي

التجديد المستخدمين تراوحت أوزانها بين (600 و 700 pb)، حيث غابت الحزم ذات الأوزان (2000-2200-2400 pb).

⊕ وأعطت المرئسة Pr1 7 حزم في عينة النبات الأم للصنف تشالنجر بأوزان تراوحت بين (600 و 2000 pb)، في حين أعطت في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP 8 حزم تراوحت أوزانها بين (600 و 2400 pb)، تشابهت 6 حزم منها مع النبات الأم وغابت حزمة واحدة بوزن (2000 pb)، وأعطت حزمتين جديدتين بوزن (1600 و 2400 pb)، أما في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له الـ Z فقد أعطت المرئسة Pr1 9 حزم تراوحت أوزانها (600 و 2400 pb) وبزيادة حزمتين عن النبات الأم بوزن (1600 و 2400 pb).



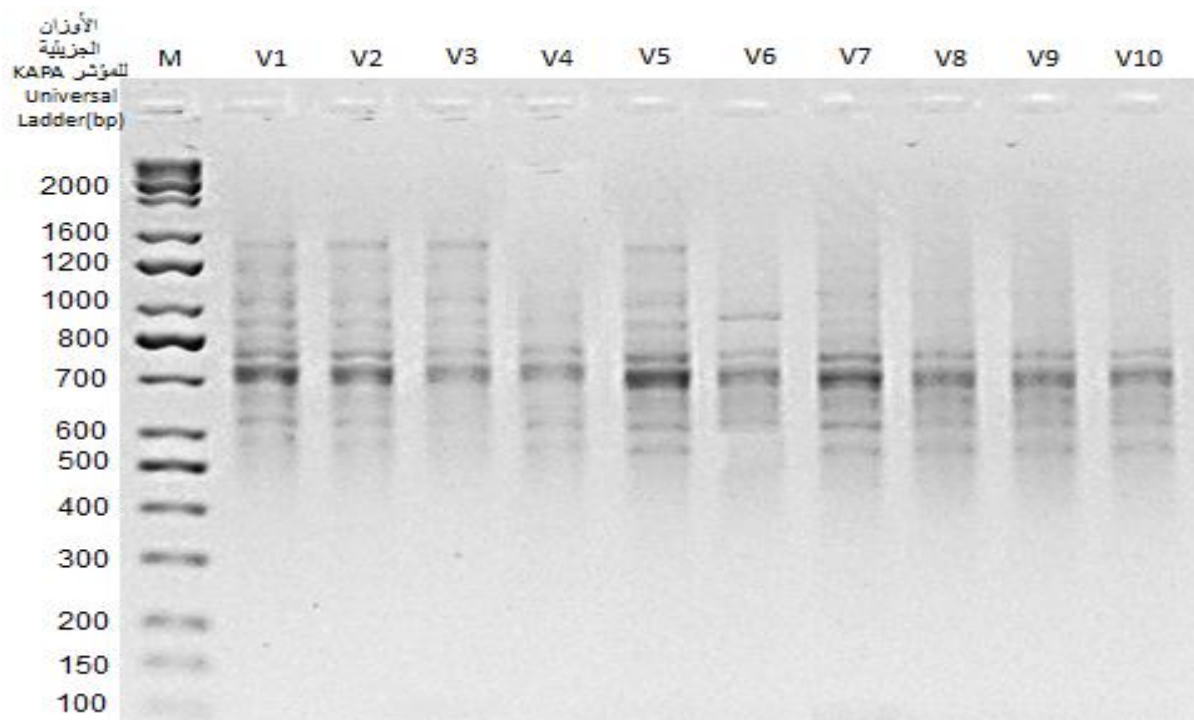
الشكل رقم (18): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr1

المريسة Pr2:

⊕ أعطت المريسة Pr2 8 حزم في النبات الأم للصنف أمارين بأوزان تراوحت بين (500 و 1600 pb)، في حين أعطت في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP 7 حزم تراوحت أوزانها بين (600 و 1600 pb)، تشابهت 6 حزم منها مع النبات الأم وغابت حزمة واحدة بطول (500 pb)، أما في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق على وسط التجديد المضاف له الـ Z فقد أعطت المريسة Pr2 5 حزم تراوحت أوزانها بين (800 و 1600 pb) متشابهة مع الحزم الناتجة في عينة النبات الأم، وغابت الحزم الثلاث الأخرى ذات الأوزان (500-600-700 pb). وفي عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة على وسط التجديد المضاف له الـ Z فقد أعطت المريسة Pr2 5 حزم مشابهة للحزم الناتجة في عينة النبات الأم تراوحت أوزانها بين (500 و 900 pb)، في حين غابت الحزم الثلاث الأخرى ذات الأوزان (1000-1200-1600 pb).

⊕ وأعطت المريسة Pr2 5 حزم في عينة النبات الأم للصنف تشالنجر بأوزان تراوحت بين (500 و 900 pb)، 4 حزم في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق على وسط التجديد المضاف له BAP ذات الأوزان (600-800-900-1200 pb)، تشابهت مع النبات الأم في الحزم الثلاث الأولى، في حين تباينت عنها بظهور الحزمة الرابعة بوزن (1200 pb) وغياب حزمتين بوزن (500-700 pb)، كما أعطت المريسة Pr2 في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة على وسط التجديد المضاف له BAP 7 حزم بأوزان تراوحت بين (500 و 1200 pb) تشابهت مع النبات الأم في 5 حزم بأطوال تراوحت بين (500 و 900 pb) وتباينت عنها بظهور حزمتين جديدتين بوزن (1000 و 1200 pb). أما في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على

وسط التجديد المضاف له الـ Z أعطت المرئسة Pr2 5 حزم تراوحت أوزانها بين (500 و 900 pb) مشابهة لحزم النبات الأم.

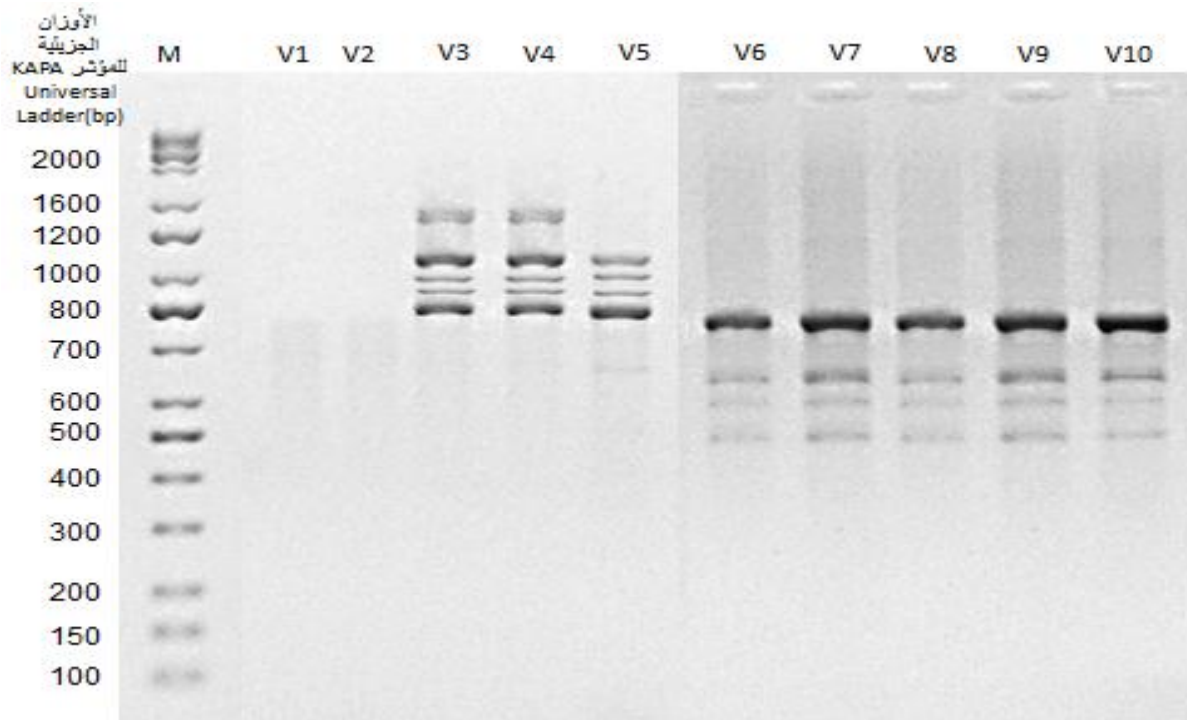


الشكل رقم (19): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr2

المرئسة Pr3:

تم الحصول بنتيجة اختبار ISSR باستخدام المرئسة Pr3 في عينة النبات الأم للصنف أمارين على 4 حزم بأوزان تراوحت بين (800 و 1400 pb). أعطت المرئسة Pr3 في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له Z 6 حزم بأوزان تراوحت بين (800 و 2000 pb) تشابهت مع النبات الأم في الحزم الأربعة الأولى وتباينت عنها بزيادة حزمتين جديدتين (1600 و 2000 pb)، في حين لم تظهر أية حزمة في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP.

أعطت المرئسة Pr3 4 حزم تراوحت أوزانها (500 و 1000 pb) في عينة النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين.



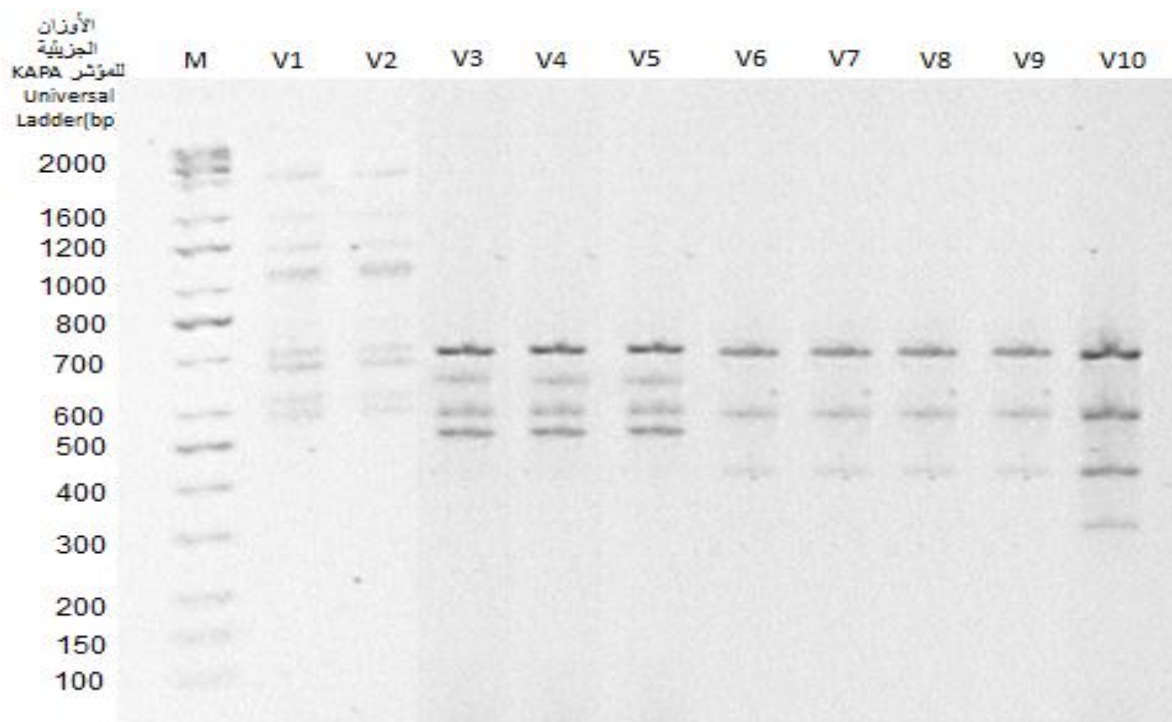
الشكل رقم (20): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr3

المرئسة Pr4:

⊕ أظهرت نتائج اختبار ISSR باستخدام المرئسة Pr4 على عينة النبات الأم وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات للصنف أمارين على وسط التجديد المضاف له الـ Z 4 حزم تراوحت بين (500 و 800 pb)، في حين أعطت المرئسة Pr4 باختبارها على عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات للصنف أمارين على وسط التجديد المضاف له BAP 8 حزم بأوزان تراوحت بين (600 و 2000 pb)، حيث غابت الحزمة بوزن (500 pb) وتشابهت مع النبات الأم في 3 حزم بأوزان (600-700-800 pb) وأعطت 5 حزم جديدة ذات الأوزان التالية (900-1000-1400-1600-2000 pb).

⊕ وأعطت المرئسة Pr4 4 حزم ذات الأوزان (400-500-600-800 pb) في عينة النبات الأم للصنف تشالنجر، أما في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط

التجديد المستخدمين فقد أعطت المرئسة Pr4 3 حزم متشابهة مع النبات الأم وغابت فيها الحزمة ذات الوزن الجزيئي (400 pb).



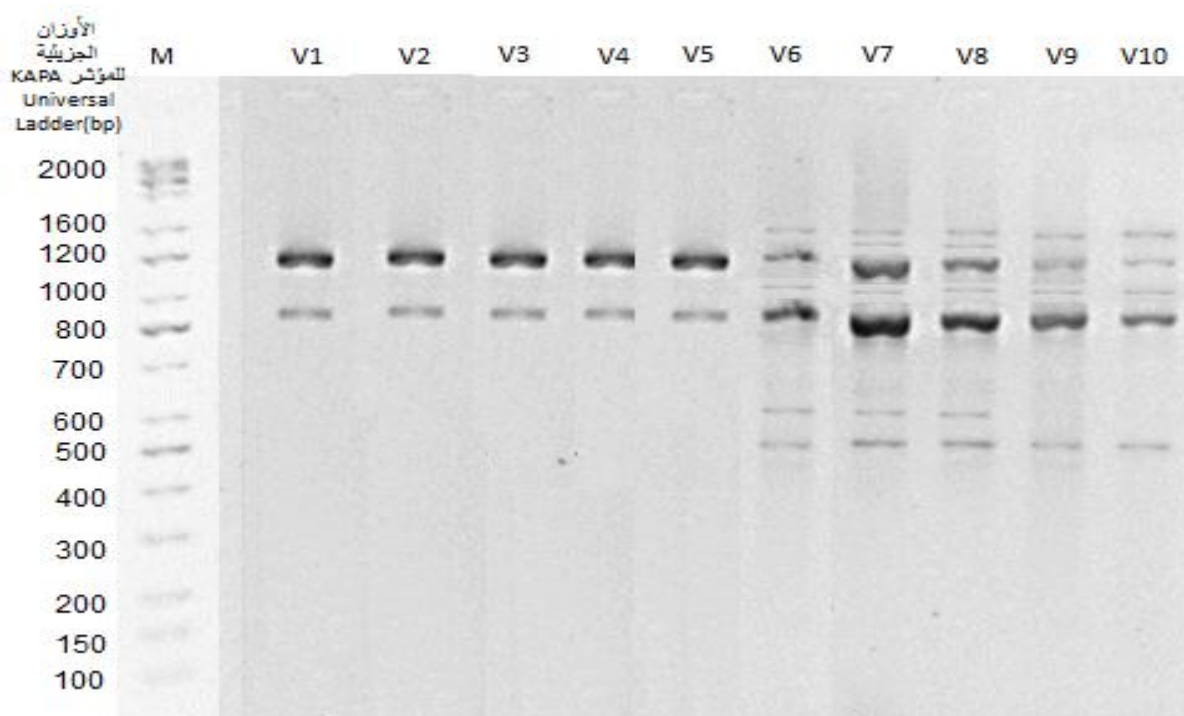
الشكل رقم (21): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr4

المرئسة Pr5:

⊕ أعطت المرئسة Pr5 حزمتين فقط (1000 و 1600 pb) وذلك عند إجراء اختبار ISSR على عينة النبات الأم للصنف أمارين وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين.

⊕ في حين أعطت المرئسة Pr5 عند إجراء اختبار ISSR على عينة النبات الأم للصنف تشالنجر 5 حزم ذات الأوزان الجزيئية (500-900-1000-1200-1600 pb)، وأعطت في عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات أوراق الصنف تشالنجر على وسط التجديد المضاف له BAP 6 حزم، تشابهت مع النبات الأم في 5 حزم، وظهرت حزمة جديدة بوزن (600 pb). وأعطت في عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات سلاميات الصنف تشالنجر على وسط التجديد المضاف له BAP 7 حزم، تشابهت

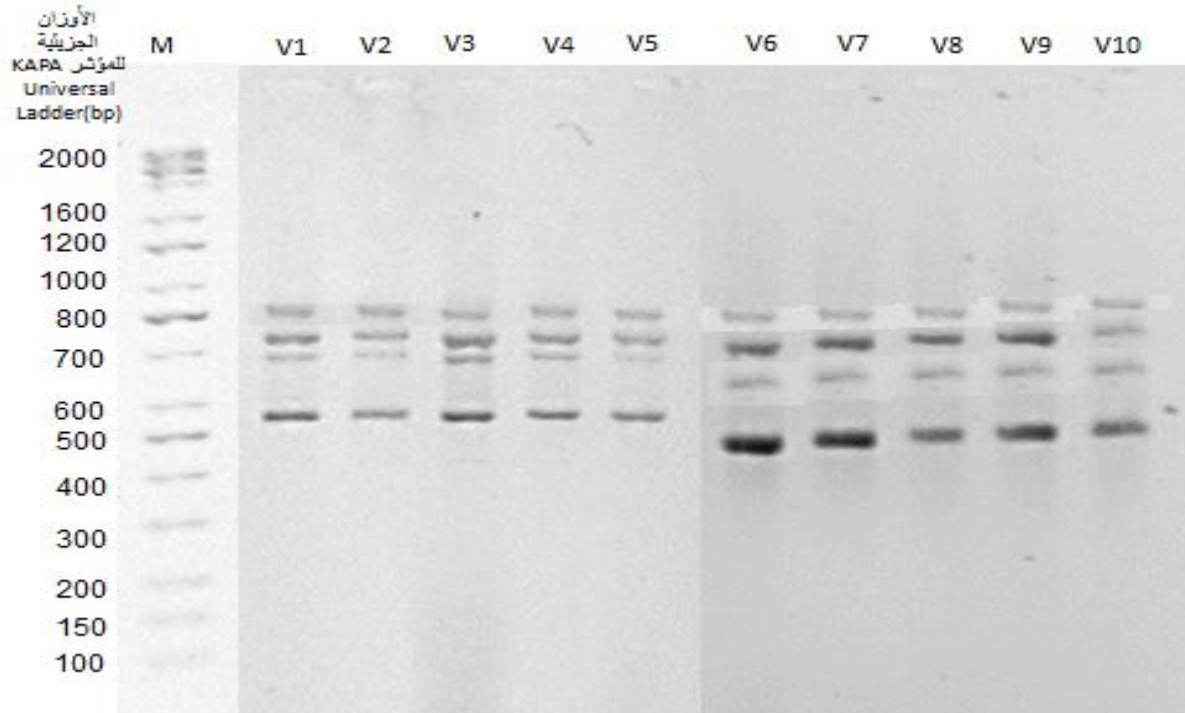
مع النبات الأم في 5 حزم، وظهرت حزمتين جديدتين بوزن (pb 1400-600). كذلك بالنسبة عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات أوراق الصنف تشالنجر على وسط التجديد المضاف له الـ Z 7 حزم، ، تشابهت مع النبات الأم في 5 حزم، وظهرت حزمتين جديدتين بوزن (pb 1400-600)، في حين كانت نتيجة اختبار ISSR باستخدام المرئسة Pr5 على عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات سلاميات الصنف تشالنجر على وسط التجديد المضاف له الـ Z مماثلة لعينة النبات الأم.



الشكل رقم (22): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr5

المرئسة Pr6:

كانت نتيجة اختبار ISSR باستخدام المرئسة Pr6 متماثلة في الصنفين المدروسين أمارين وتشالنجر. حيث أعطت 4 حزم بأوزان (pb 900-800-600-500) في كلٍ من عينات النبات الأم وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات لكلا الصنفين على وسطي التجديد المستخدمين.



الشكل رقم (23): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr6

المرئسة Pr7:

⊕ أعطت المرئسة Pr7 6 حزم ذات الأوزان التالية (400-500-600-700-800-1000 pb) في كل

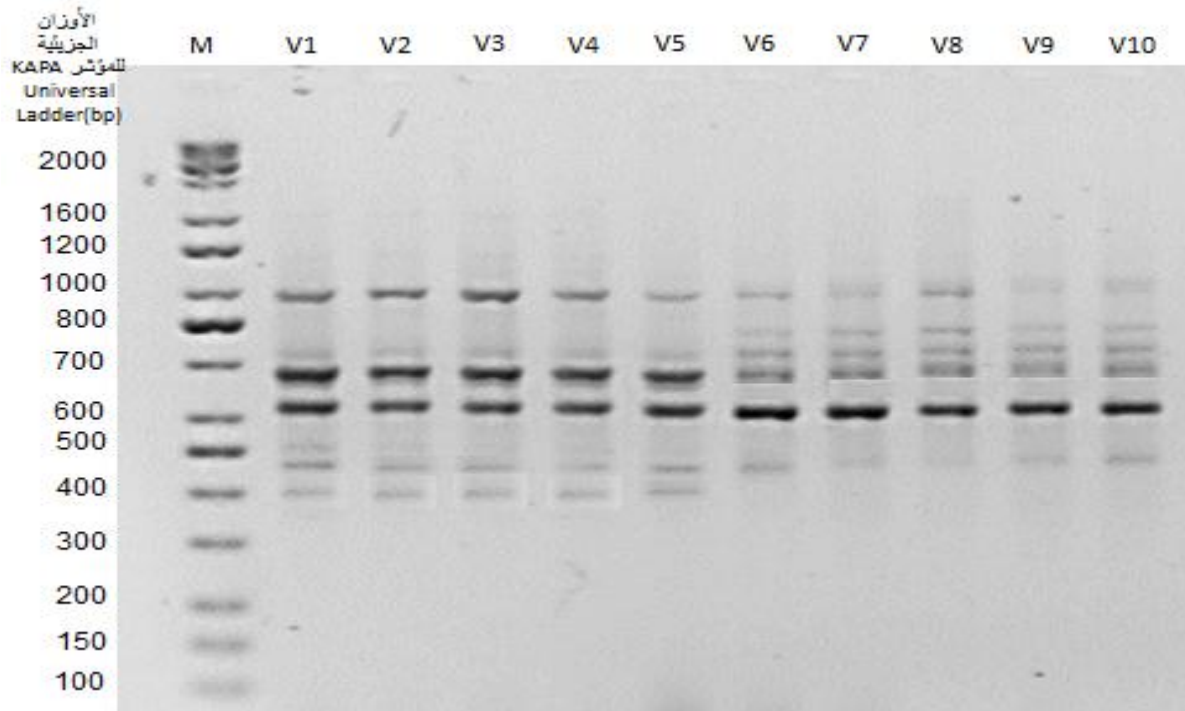
من عينات النبات الأم للصنف أمارين وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات

على وسطي التجديد المستخدمين.

⊕ وكذلك أعطت 6 حزم ذات الأوزان التالية (400-600-700-800-900-1000 pb) في كل من

عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات

على وسطي التجديد المستخدمين.



الشكل رقم (24): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr7

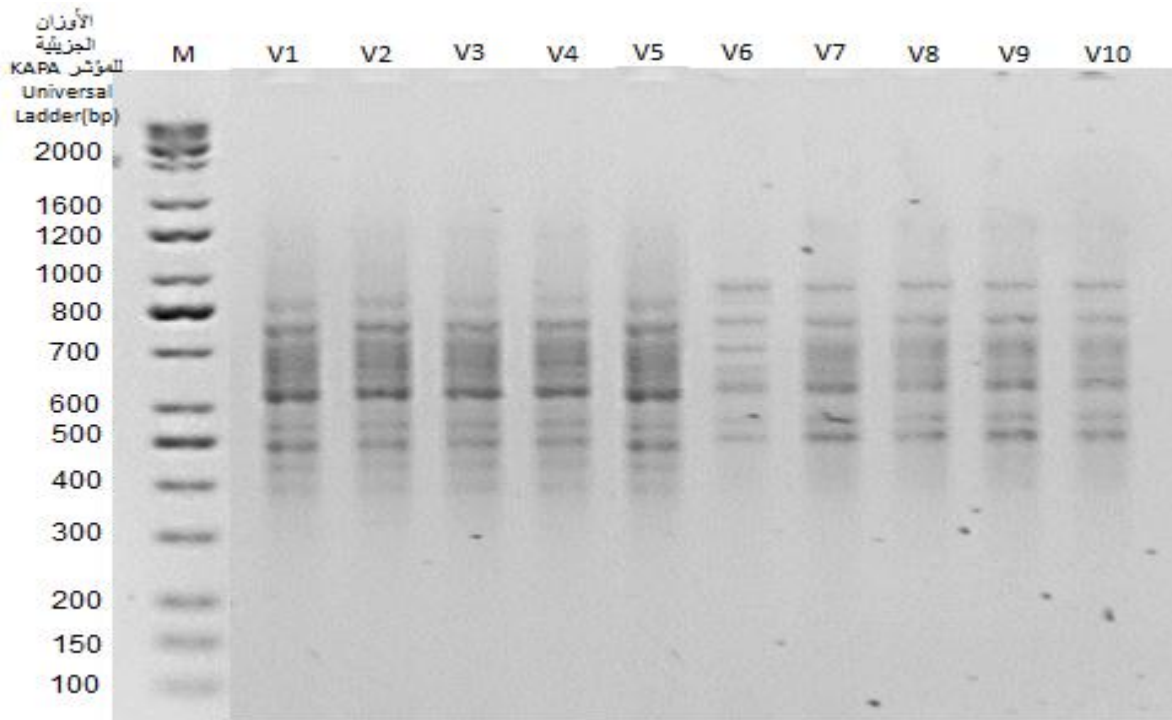
المرئسة Pr8:

⊕ أعطت المرئسة Pr8 7 حزم ذات الأوزان التالية (400-500-600-700-800-900-1000 pb)

في كلٍ من عينات النبات الأم للصنف أمارين وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين.

⊕ في حين أعطت 6 حزم ذات الأوزان التالية (500-600-700-800-900-1000 pb) في كلٍ من

عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين.



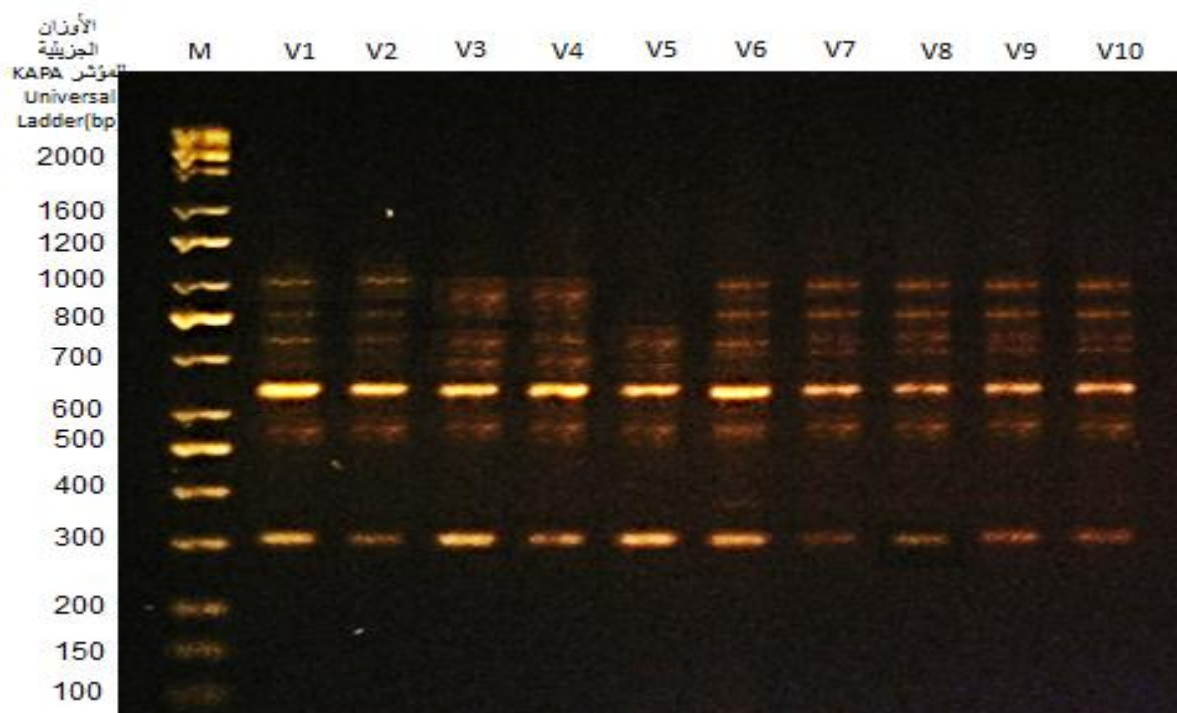
الشكل رقم (25): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr8

المرئسة Pr9:

⊕ كانت نتيجة اختبار ISSR باستخدام المرئسة Pr9 متباينة في عينات النبات الأم للصنف أمارين والكالس العضوي المتكون منه. حيث أعطت 5 حزم في عينة النبات الأم بأوزان (400-500-600-800 pb). في حين أعطت نتيجة الاختبار لعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP 6 حزم تراوحت أوزانها بين (400 و 1200 pb)، تشابهت 4 حزم منها مع النبات الأم وغابت حزمة واحدة بوزن (800 pb)، وظهرت حزمتين جديدتين بأوزان (1000-1200 pb).

وقد أعطت المرئسة Pr9 عند إجراء اختبار ISSR على عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له الـ Z 6 حزم بأوزان تراوحت بين (400 و 1200 pb)، تشابهت مع النبات الأم في 5 حزم وتباينت عنها بظهور حزمة جديدة بوزن (1200 pb).

⊕ أدى اختبار المرئسة Pr9 على عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين إلى الحصول على 7 حزم بأوزان تراوحت بين (400 و 1200 pb).

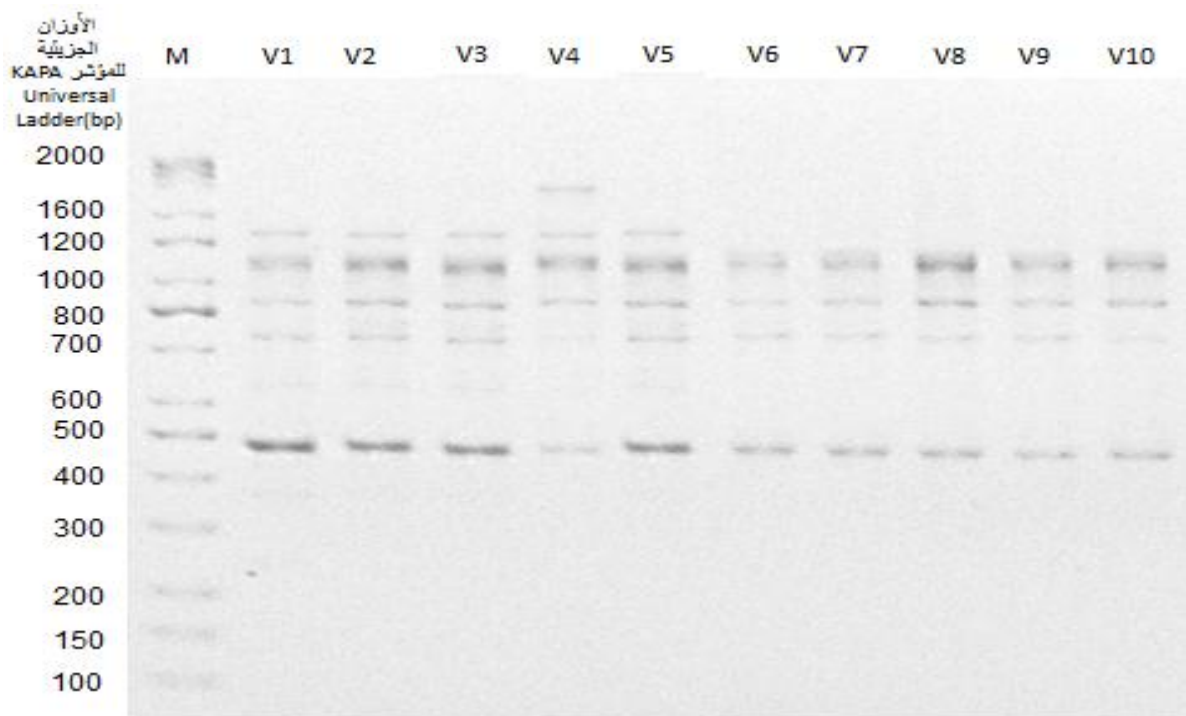


الشكل رقم (26): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr9

المرئسة Pr10:

⊕ أعطت المرئسة Pr10 في النبات الأم للصنف أمارين 5 حزم بأوزان (1000-800-600-500-1400 pb)، وكذلك في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق على وسط التجديد المضاف له الـ Z، في حين أعطت في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة على وسط التجديد المضاف له الـ Z 5 حزم تراوحت أوزانها بين (500 و 2000 pb) حيث تشابهت مع النبات الأم في 4 حزم وغابت حزمة واحدة بوزن (600 pb) وظهرت حزمة جديدة بوزن (2000 pb).

⊕ أعطت المرئسة Pr10 4 حزم ذات الأوزان التالية (500-800-1000-1400 pb) في كل من عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين.

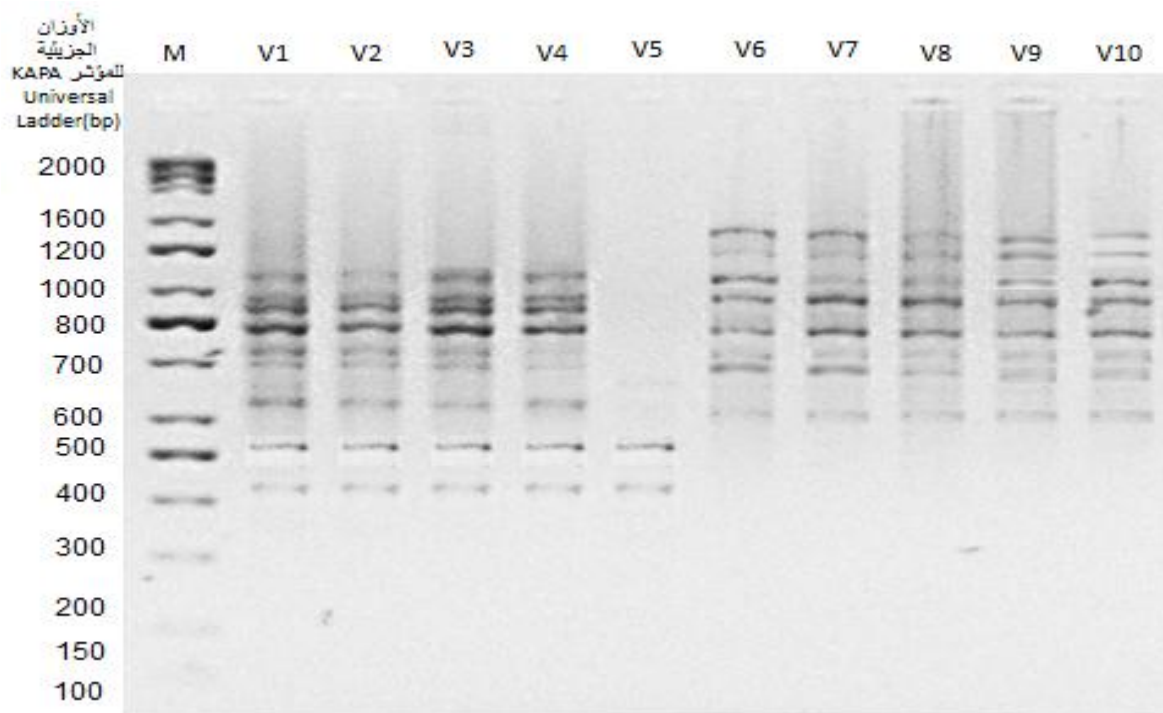


الشكل رقم (27): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr10

المرئسة Pr11:

⊕ أعطت المرئسة Pr11 عند إجراء اختبار ISSR على عينات النبات الأم للصنف أمارين حزمتين فقط (400 و 500 pb)، في حين أعطت في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين 9 حزم بأوزان تراوحت بين (400 و 1400 pb)، تشابهت مع النبات الأم في الحزمتين السابقتين وتباينت عنها بظهور 7 حزم جديدة بأوزان تراوحت بين (600 و 1400 pb).

⊕ أما عند اختبار المرئسة Pr9 على عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين فقد تم الحصول على 8 حزم بأوزان تراوحت بين (400 و 1200 pb).



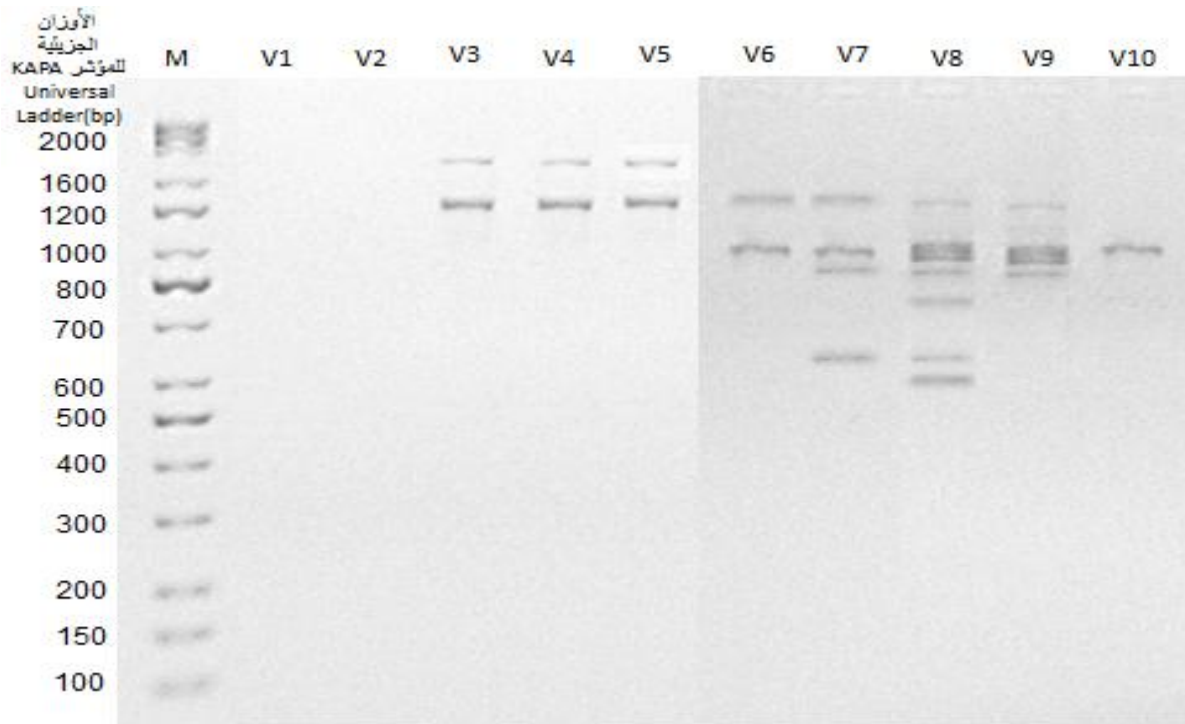
الشكل رقم (28): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr11

المرئسة Pr12:

⊕ أعطت المرئسة Pr12 في عينة النبات الأم للصنف أمارين حزمتين فقط (1600 و 2000 pb)، وكذلك كانت نتيجة اختبار ISSR باستخدام هذه المرئسة على عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد Z حيث ظهرت الحزمتين السابقتين أيضاً، في حين لم تظهر أية حزمة عند اختبار هذه المرئسة على عينات الكالس الأخرى في الصنف أمارين.

⊕ أعطت المرئسة Pr12 باختبارها على عينة النبات الأم للصنف تشالنجر حزمة واحدة بوزن (1000 pb)، في حين أعطت حزمتين في عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق على وسط التجديد المضاف له BAP تشابهت مع النبات الأم في حزمة واحدة وتباينت عنها بظهور حزمة جديدة

بوزن (pb 1600)، وقد ظهرت 4 حزم في عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة على وسط التجديد المضاف له BAP تشابهت مع النبات الأم في حزمة واحدة وتباينت عنه في 3 حزم بأوزان (pb 1600-900-600). أما عند اختبار هذه المرئسة على عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق على وسط التجديد المضاف له الـ Z فقد أعطت 6 حزم متشابهة مع النبات الأم في حزمة واحدة وتباينت عنها في 5 حزم جديدة بأوزان (pb 1000-900-800-600-500)، في حين أعطت في عينة الكالس العضوي المتكون من معلقات السلامة على وسط التجديد المضاف له الـ Z 3 حزم تشابهت في حزمة واحدة مع النبات الأم وتباينت عنه في حزمتين جديدتين (900 و 1600 pb).



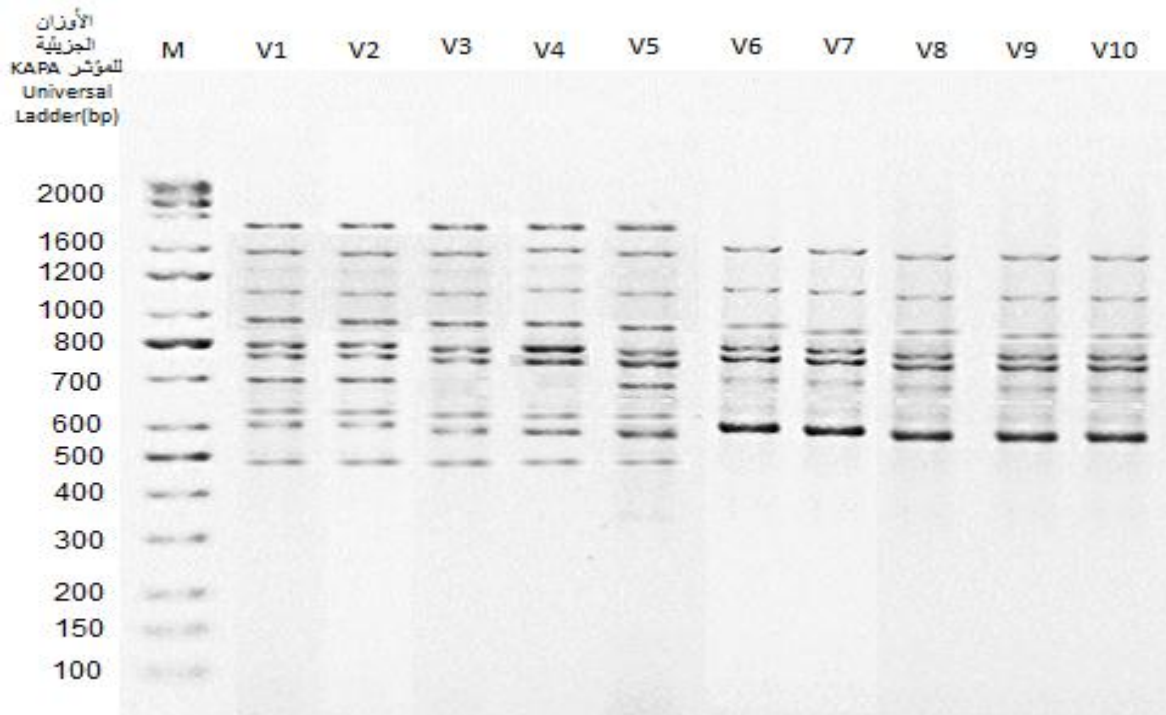
الشكل رقم (29): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr12

المرئسة Pr13:

أعطت المرئسة Pr13 عند اختبارها على النبات الأم للصنف أمارين 10 حزم بأوزان تراوحت بين (400 و 2000 pb)، وكانت النتيجة مماثلة عند اختبارها على عينات الكالس العضوي المتكون من

معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP. في حين أعطت هذه المرئسة باختبارها على عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له الـ Z 9 حزم متشابهة لحزم الناتجة في النبات الأم حيث غابت حزمة واحدة بوزن (700 pb).

⊕ أدى اختبار المرئسة Pr13 على عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين إلى الحصول على 8 حزم متشابهة فيما بينها بأوزان تراوحت بين (500 و 2000 pb).

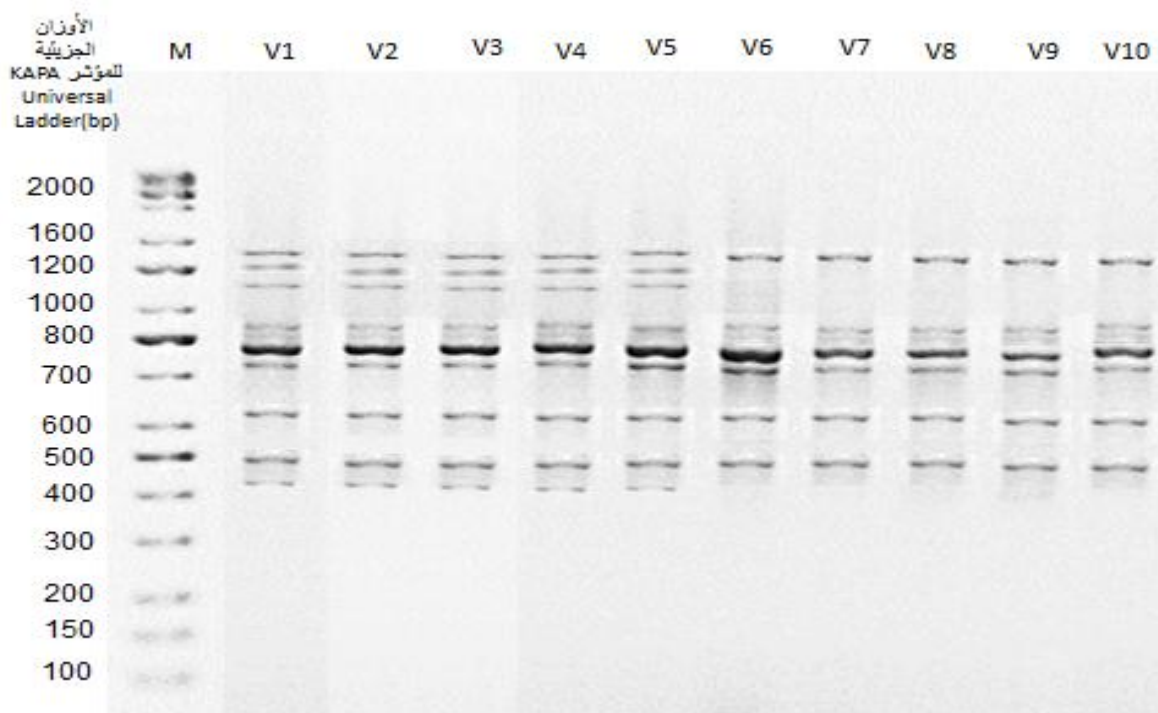


الشكل رقم (30): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr13

المرئسة Pr14:

⊕ كانت نتيجة الاختبار متماثلة عند اختبار المرئسة Pr14 على عينات النبات الأم للصنف أمارين وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين، حيث أعطت 10 حزم متشابهة فيما بينها بأوزان تراوحت بين (400 و 2000 pb).

⊕ كذلك أدى اختبار المرئسة Pr14 على عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين إلى الحصول على 7 حزم متشابهة فيما بينها بأوزان تراوحت بين (500 و 2000 pb).

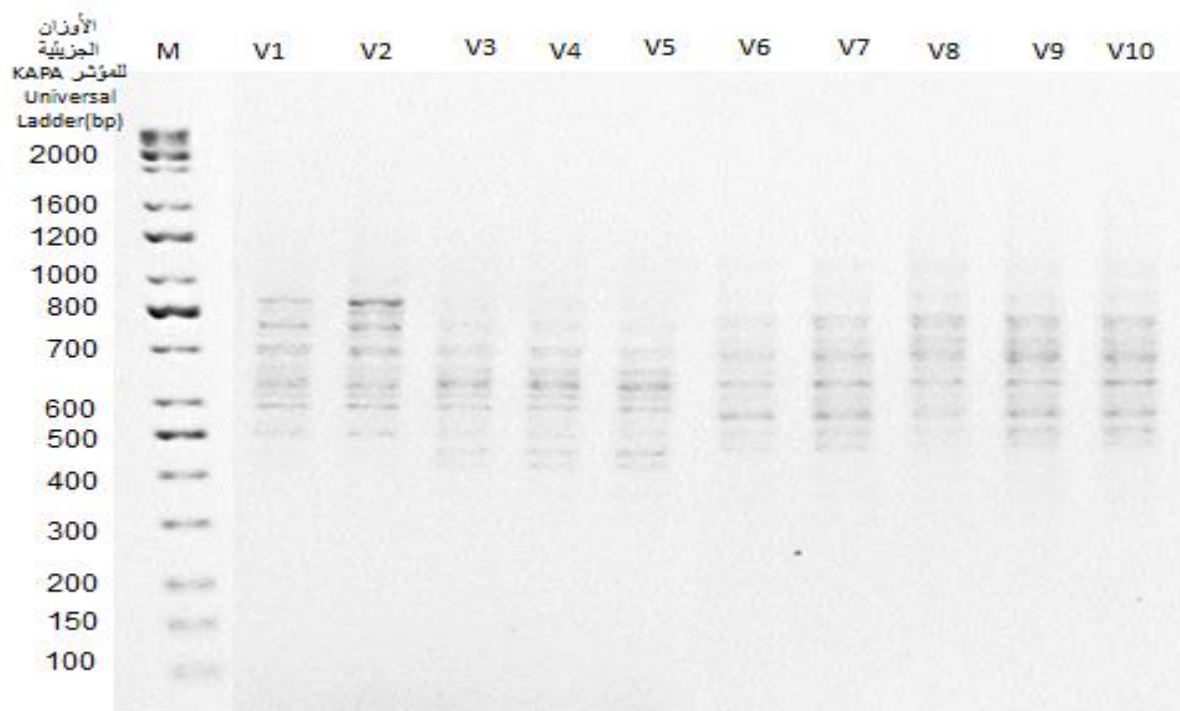


الشكل رقم (31): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr14

المرئسة Pr15:

⊕ أعطت المرئسة Pr15 عند اختبارها على عينات النبات الأم للصنف أمارين وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له الـ Z 7 حزم متشابهة فيما بينها بأوزان تراوحت بين (500 و 1200 pb)، في حين أدى اختبار هذه المرئسة على عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP إلى الحصول على 7 حزم بأوزان تراوحت بين (600 و 1200 pb) حيث تشابهت مع النبات الأم في 6 حزم منها وغابت حزمة واحدة بوزن (500 pb) وظهرت حزمة جديدة بوزن (1400 pb).

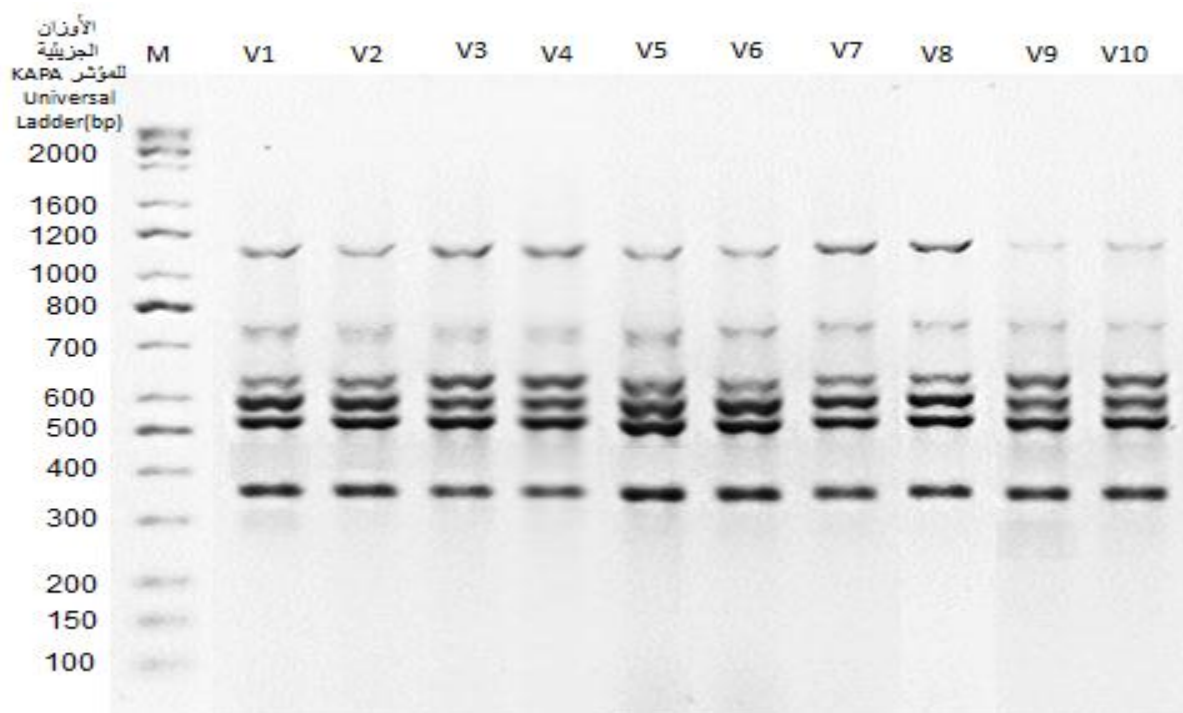
⊕ كما أعطت المرئسة Pr15 في عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له Z 6 حزم متشابهة فيما بينها بأوزان تراوحت بين (500 و 1000 pb)، في حين أعطت هذه المرئسة في عينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP إلى الحصول على 5 حزم مشابهة للحزم الناتجة عند اختبار النبات الأم حيث غابت حزمة واحدة بوزن (900 pb).



الشكل رقم (32): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr15

المرئسة Pr16:

كانت نتيجة اختبار ISSR باستخدام المرئسة Pr16 متماثلة في الصنفين المدروسين أمارين وتشالنجر، وذلك عند اختبار كل من عينات النبات الأم وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات لكلا الصنفين على وسطي التجديد المستخدمين. حيث أعطت 6 حزم بأوزان (300-400-500-600-800-1200 pb).

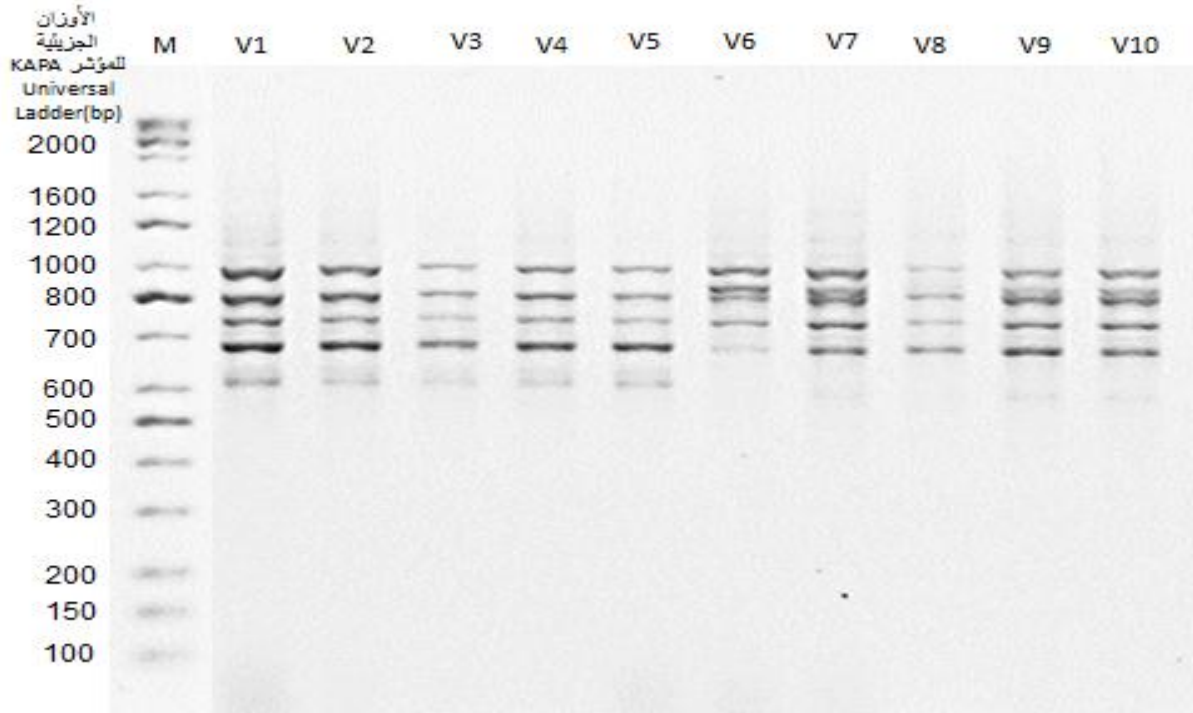


الشكل رقم (33): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr16

المرئسة Pr17:

⊕ أدى اختبار المرئسة Pr17 على عينات النبات الأم للصنف أمارين وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين إلى الحصول على 5 حزم متشابهة فيما بينها ذات الأوزان التالية (400-500-600-800-1200 pb).

⊕ في حين أعطت المرئسة Pr17 باختبارها على عينات النبات الأم للصنف تشالنجر وعينات الكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات على وسطي التجديد المستخدمين 5 حزم متشابهة فيما بينها ذات الأوزان التالية (500-600-800-900-1200 pb).



الشكل رقم (34): صورة لهلامة الأغاروز لـ DNA عينات البطاطا باستخدام المرئسة Pr17

4-6- تأثير منظمات النمو النباتية BAP و Z ومصدر الخزعة النباتية (الأوراق والسلاميات) على التباين الوراثي بين النبات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية لأصناف البطاطا المدروسة :

تم تضخيم العينات المدروسة من صنف البطاطا أمارين وتشالنجر (النبات الأم والكالس التكويني العضوي المتكون من المعلقات الخلوية للأوراق والسلاميات على وسطي التجديد بتأثير منظمات النمو النباتية BAP و Z) باستخدام 17 مرئسة وقد أعطت جميعها تضاعفات.

4-6-1 الصنف أمارين:

يبين الجدول رقم (16) أن عدد الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم عينات النبات الأم في الصنف أمارين 98 حزمة، وأن نواتج تضخيم DNA عينات الكالس العضوي المتكون بتأثير BAP من المعلقات

الخلوية لكل من الأوراق والسلاميات للصنف أمارين 82 حزمة متشابهة مع الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA النبات الأم، في حين كان عدد الحزم المتباينة والغائبة (غير المتشابهة) 28 حزمة، فكانت النسبة المئوية للتباين الوراثي (25.45%) في كل من الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية للأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له BAP. كما يظهر الجدول رقم (15) أن نواتج تضخيم DNA عينات الكالس العضوي المتكون بتأثير Z من المعلقات الخلوية لكل من أوراق وسلامييات الصنف أمارين 88 حزمة متشابهة مع الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA النبات الأم، في حين كان عدد الحزم المتباينة والغائبة (غير المتشابهة) 19 حزمة، فكانت النسبة المئوية للتباين الوراثي (17.76%) في كل من الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية للأوراق والسلاميات على وسط التجديد المضاف له Z.

كما يشير الجدول رقم (16) إلى أن تأثير مصدر الخزعة النباتية (الأوراق والسلاميات) على التباين الوراثي المدروس في صنف البطاطا أمارين كان متماثلاً عند استخدام الساييتوكينين BAP و Z في وسط التجديد.

وبمقارنة تأثير الساييتوكينين في وسط التجديد يظهر الجدول رقم (16) أن متوسط التباين الوراثي المدروس في أمارين بتأثير BAP بلغ (25.45%) أعلى مقارنة مع تأثير Z حيث بلغ متوسط التباين (17.76%)

الجدول رقم (16):التباين الوراثي بين النبات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية للصنف أمارين

primers	العينات المدروسة												
	v5	v1			v2			v3			v4		
	عدد الحزم الكلية في النبات الأم	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %
Pr1	9	3.00	6.00	33.33	3.00	6.00	33.33	3.00	6.00	33.33	3.00	6.00	33.33
Pr2	8	1.00	7.00	12.50	1.00	7.00	12.50	3.00	5.00	37.50	3.00	5.00	37.50
Pr3	4	4.00	0.00	100.00	4.00	0.00	100.00	2.00	4.00	33.33	2.00	4.00	33.33
Pr4	4	6.00	3.00	66.67	6.00	3.00	66.67	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00
Pr5	2	0.00	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00
Pr6	4	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00
Pr7	7	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00
Pr8	9	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00
Pr9	5	3.00	4.00	42.86	3.00	4.00	42.86	1.00	5.00	16.67	1.00	5.00	16.67
Pr10	5	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00
Pr11	2	7.00	2.00	77.78	7.00	2.00	77.78	9.00	2.00	81.82	9.00	2.00	81.82
Pr12	2	2.00	0.00	100.00	2.00	0.00	100.00	0.00	2.00	0.00	0.00	2.00	0.00
Pr13	10	0.00	10.00	0.00	0.00	10.00	0.00	1.00	9.00	10.00	1.00	9.00	10.00
Pr14	9	0.00	9.00	0.00	0.00	9.00	0.00	0.00	9.00	0.00	0.00	9.00	0.00
Pr15	7	2.00	6.00	25.00	2.00	6.00	25.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00
Pr16	6	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00
Pr17	5	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00
المجموع	98	28.00	82.00	25.45	28.00	82.00	25.45	19.00	88.00	17.76	19.00	88.00	17.76
متوسط نسبة التباين لوسط التجديد %		25.45						17.76					
متوسط نسبة التباين في الصنف %		21.61											

4-6-2 الصنف تشالنجر:

يوضح الجدول رقم (17) أن عدد الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA النبات الأم للصنف تشالنجر 95 حزمة، في حين أعطت نواتج تضخيم DNA عينات الكالس العضوي المتكونة بتأثير الـ BAP من المعلقات الخلوية لأوراق الصنف تشالنجر 89 حزمة متشابهة مع الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA النبات الأم، في حين كان عدد الحزم المتباينة والغائبة (غير المتشابهة) 10 حزم، لتكون النسبة المئوية للتباين الوراثي (10.10%).

كما يبين الجدول رقم (16) أيضاً أن نواتج تضخيم DNA عينات الكالس العضوي المتكونة بتأثير الـ BAP من المعلقات الخلوية لسلاميات الصنف تشالنجر قد أعطت 90 حزمة متشابهة مع الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA النبات الأم، في حين كان عدد الحزم المتباينة والغائبة (غير المتشابهة) 11 حزمة، لتكون النسبة المئوية للتباين الوراثي (10.89%).

ويشير الجدول رقم (17) أن نواتج تضخيم DNA عينات الكالس العضوي المتكونة من المعلقات الخلوية لأوراق الصنف تشالنجر على وسط التجديد المضاف له Z قد أعطت 92 حزمة متشابهة مع الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA النبات الأم، و 10 حزم متباينة وغائبة (غير متشابهة)، وكانت النسبة المئوية للتباين الوراثي المدروس (9.80%).

في حين إن نواتج تضخيم DNA عينات الكالس العضوي المتكونة من المعلقات الخلوية لسلاميات الصنف تشالنجر على وسط التجديد المضاف له Z قد أعطت 92 حزمة متشابهة مع الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA النبات الأم، و 5 حزم متباينة وغائبة (غير متشابهة)، وبلغت النسبة المئوية للتباين الوراثي المدروس (5.15%).

يلاحظ من الجدول رقم (17) أن تأثير مصدر الخزعة (الأوراق والسلاميات) في التباين الوراثي المدروس في صنف البطاطا تشالنجر كان مقارباً عند استخدام السيتوكينين الـ BAP في وسط التجديد

(10.10 و 10.89 %) للأوراق والسلاميات على التوالي، في حين كان تأثير الأوراق كمصدر للخرقة على التباين الوراثي في الصنف تشالنجر (9.80%) أعلى مقارنة مع تأثير السلامة حيث بلغت نسبة التباين الوراثي (5.15%).

وبمقارنة تأثير السيتوكينين في وسط التجديد على التباين الوراثي المدروس في الصنف تشالنجر، يظهر الجدول رقم (17) أن متوسط التباين عند استخدام الـ BAP في وسط التجديد بلغ (10.50%) أعلى مقارنة مع تأثير الـ Z في وسط التجديد حيث بلغ متوسط التباين الوراثي (7.48%).

يظهر الجدولين رقم (16) ورقم (17) أن التباين الوراثي المدروس في الصنف أمارين كان أعلى مقارنة مع التباين الوراثي في الصنف تشالنجر، سواءً بالنسبة لوسط التجديد أم لمصدر الخرقة النباتية (الأوراق والسلاميات) حيث كان متوسط التباين الوراثي في الصنف أمارين (21.61%) وفي الصنف تشالنجر (8.99%).

الجدول رقم (16): التباين الوراثي بين النبات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية للصف تشالنجر

primers	العينات المدروسة												
	v10	v6			v7			v8			v9		
	عدد الحزم الكلية في النبات الأم	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %	عدد الحزم المتباينة والغائبة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التباين %
Pr1	7	2.00	6.00	25.00	2.00	6.00	25.00	2.00	7.00	22.22	2.00	7.00	22.22
Pr2	5	3.00	5.00	37.50	2.00	5.00	28.57	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00
Pr3	4	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00
Pr4	4	1.00	3.00	25.00	1.00	3.00	25.00	1.00	3.00	25.00	1.00	3.00	25.00
Pr5	5	1.00	5.00	16.67	2.00	5.00	28.57	2.00	5.00	28.57	0.00	5.00	0.00
Pr6	4	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00
Pr7	7	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00
Pr8	7	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00
Pr9	7	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00
Pr10	4	1.00	3.00	25.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.00	0.00
Pr11	8	0.00	8.00	0.00	0.00	8.00	0.00	0.00	8.00	0.00	0.00	8.00	0.00
Pr12	1	1.00	1.00	50.00	3.00	1.00	75.00	5.00	1.00	83.33	2.00	1.00	66.67
Pr13	8	0.00	8.00	0.00	0.00	8.00	0.00	0.00	8.00	0.00	0.00	8.00	0.00
Pr14	7	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00
Pr15	6	1.00	5.00	16.67	1.00	5.00	16.67	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00
Pr16	6	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	6.00	0.00
Pr17	5	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00
المجموع	95	10.00	89.00	10.10	11.00	90.00	10.89	10.00	92.00	9.80	5.00	92.00	5.15
متوسط نسبة التباين لوسط التجديد %		10.50						7.48					
متوسط نسبة التباين للصنف %		8.99											

تعزى التباينات الوراثية الجسمية Somoclonal Variation لاختلاف الطراز الوراثي أو المجموعة الصبغية الأساسية وتضاعفاتها (Bayliss، 1980)، نتيجة لعمليات الحذف أو الإضافة أو التكرار أو الانقلاب في النكلوتيدات المكونة للمورثة على مستوى خلايا الكالس (Marthur و Kumar، 2004).

كما تؤدي إضافة النسب العالية من منظمات النمو إلى الأوساط المغذية في المزارع الخلوية إلى تغيير في السلوك الوراثي الخلوي لهذه الخلايا، ما أحدث تغييراً ملحوظاً في أعداد الصبغيات وخاصة بوجود الأوكسين 2,4-D (Dale و Deambrogia، 1979).

كما تعزى مستويات التباين الوراثي المرتفعة في الكالس العضوي المتكون بتأثير السيتوكينين الـ BAP لكونه سيتوكينين صناعي، في حين أدى تأثير الزياتين إلى تباين وراثي منخفض نسبياً كونه سيتوكينين منتج طبيعياً مما يجعل امتصاصه أسهل من قبل الخلايا النباتية لذلك أدى إلى تباين (sadohara، 1993).

4-7 الاستنتاجات:

1. تُعد عملية تعقيم الدرنات بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 4% فعالة في الحد من نمو مسببات المرضية في مرحلة الزرع الأولي.
2. تتحدد نسبة استحداث الكالس بشكل رئيس باستخدام منظم النمو 2,4-D ، حيث تبين أن استخدام التركيز 3مغ/ل 2,4-D هو الأمثل لاستحداث الكالس من أوراق وسلاميات صنف البطاطا أمارين وتشالنجر.
3. إمكانية تأسيس وزرع المعلقات الخلوية بدءاً من كالس الأوراق والسلاميات على وسط $MS \frac{1}{2}$ مضافاً له 3 مغ/ل 2,4-D.
4. ازدادت الكثافة الخلوية في المعلقات الخلوية عند الصنف أمارين في الأسبوعين الثالث والرابع بشكل ملحوظ، في حين ازدادت بشكل تدريجي في المعلقات الخلوية عند الصنف تشالنجر.
5. تفوقت المعلقات الخلوية للسلاميات على مثيلاتها للأوراق عند الصنف أمارين في معدل الانقسام الخلوي، بينما لم يلاحظ وجود فروق معنوية فيما بينها عند الصنف تشالنجر.
6. تفوقت حيوية الخلايا في المعلقات الخلوية للصنف أمارين، بالمقارنة مع الصنف تشالنجر للأسبوعين الثالث والرابع.
7. الحصول على أعلى نسبة للكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية، باستخدام التركيز 1.75 مغ/ل من السيتوكينين BAP.
8. أظهر استخدام السيتوكينين الزياتين Z فعالية أقل من السيتوكينين بنزيل أمينو بورين BAP في تجديد الكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية، وتباينت المعلقات في استجابتها للتجديد بتأثير الـ Z، فقد كان استخدام التركيز 1.5 مغ/ل الأمثل للكالس العضوي المتكون من معلقات الأوراق والسلاميات للصنف أمارين ، و معلقات الأوراق للصنف تشالنجر، في حين كان استخدام

التركيز 0.5 مغ/ل من الزيئات هو الأمثل للكالس العضوي المتكون من السلاميات للصنف تشالنجر.

9. تأثير مصدر الخزعة النباتية (الأوراق والسلاميات) في التباين الوراثي بين النباتات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية في الصنف أمارين كان متماثلاً وذلك سواءً عند استخدام السيتوكينين BAP أو Z في وسط التجديد.

10. تأثير مصدر الخزعات النباتية (الأوراق والسلاميات) في التباين الوراثي بين النباتات الأم والكالس العضوي المتكون من المعلقات الخلوية في الصنف تشالنجر كان متقارباً عند استخدام السيتوكينين BAP في وسط التجديد في حين كان تأثير الأوراق في التباين الوراثي المدروس أعلى مقارنة مع تأثير السلاميات عند استخدام الزيئات Z في وسط التجديد.

11. إن التباين الوراثي المدروس في كلا الصنفين (أمارين وتشالنجر) والناتج عند استخدام السيتوكينين BAP في وسط التجديد كان أعلى مقارنة مع التباين الوراثي الناتج عند استخدام الزيئات Z.

4-8 المقترحات والتوصيات :

1. تأسيس المعلقات الخلوية لأنواع وأصناف نباتية ودراسة خصائصها من خلال مؤشرات نمو أخرى.
2. استخدام تقنية المعلقات الخلوية في الدراسات الفيزيولوجية والخلوية والوراثية.
3. استخدام الكثافة الخلوية ومعدل الانقسام الخلوي كمؤشرات لنمو الخلايا في المعلقات.
4. التوسع في زرع المعلقات الخلوية كتقانة فعالة في الحصول على الأجنة الخضرية ولإنتاج المركبات الثانوية الفعالة في النباتات.
5. تطبيق تقنية المعلقات الخلوية في برامج التحسين الوراثي للبطاطا وللأنواع النباتية الأخرى .
6. الاستفادة من تقنية اختبار حيوية الخلايا TTC للوقوف على حيوية المعلقات الخلوية.
7. استخدام عدد أكبر من مرئسات ISSR لكشف التباين الوراثي.
8. استخدام تقنية ISSR وتقنيات أخرى (SSR و RAPD) في دراسة التباين الوراثي في مجال زراعة الأنسجة والتقنيات الحيوية المعتمدة عليها.
9. إجراء تسلسل نكليوتيدي لحزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم لتحديد المورثات المسؤولة عن التباين الوراثي المدروس.

4-9 المراجع References:

المراجع العربية :

المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية لعام 2014 .الجمهورية العربية السورية، وزارة الزراعة، مديرية الاقتصاد الزراعي، قسم الإحصاء.

المعري، خليل ; خيتي، مأمون ;الطويل، خالد وعبد القادر أحمد . 2008 . تكوين درينات دقيقة في بعض أصناف البطاطا بوساطة زراعة الأنسجة، ندوة البطاطا -جامعة دمشق.

المعري، خليل. 1995. إكثار النخيل بزراعة الأنسجة النباتية ، جامعة الملك فيصل، السعودية، ص 77-96.

المعري، خليل والبيسكي، فهد ومصا، ريم (2016). تأثير الإجهاد الملحي في بعض الصفات المورفولوجية والبيوكيميائية لثلاثة أصناف من البطاطا *Solanum tuberosum* ، مجلة بحوث جامعة حلب، ص17.

القباني، نور والبيسكي، فهد والمعري، خليل (2013). دراسة العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست الورقية في صنف البطاطا بينيلا، مجلة جامعة دمشق، ص19.

الموصللي، حسين علي . 2000 . البطاطا (البطاطس)- زراعتها وأفاتها - تخزينها وتصنيع منتجاتها، الطبعة الأولى، ص: 14 .

بوراس، متيادي. 1989. إنتاج الخضار .منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة، ص438-460.

بوراس، متيادي وأبوترابي، بسام والبسيط، إبراهيم . 2006 . إنتاج محاصيل الخضر -الجزء النظري - جامعة دمشق، ص: 396 - 410 .

سيد، محمود هيثم . 2001 . استخدام مؤشرات من الدنا في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير ، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه.

مسعود، كاسر . 1981 . أساسيات تربية النبات، منشورات جامعة حلب، كلية الزراعة، ص: 350 .

منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة ومكتب الكومنولث الزراعي (FAO). 2014.

المراجع الأجنبية:

Abd-Elaleem, K.G., Moawi, R.S., Khalafalla, M.M. (2009). Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum. tuberosum* L.) cultivars. Diamant. African Journal of Biotechnology 8: 2529-2534.

Abouzied, H. M. 2011. Assessment of genetic diversity among wheat somaclonal variants lines using morphological traits and molecular markers. African Journal of Biotechnology 66: 1451- 14861.

Ahloowalia, B.S. (1982). Plant regeneration from callus culture in potato. Euphytica 31: 755-759.

Albiski, F., Ismail, I. and Helali, O. 2001. Seed potato production through tissue culture. National technical report. FAO, Syria.

AlHussaini, Z.A, Yousif , SH. A. and AL-Ajeely, S.A. 2015. Effect of Different Medium on Callus Induction and Regeneration in Potato Cultivars. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. Baghdad-Iraq. ISSN: 2319-7706 Vol.4 ,No. 5, pp. 856-865.

AlMaarri, K., Massa, R. and Albiski, F. 2012. Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants. The Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology, Vol. 29, pp.237–243

Alwareh, H., Trolinder, N.L. and Goodin. J.R. (1989). Callus initiation, shoot regeneration and micropropagation of three potato cultivars. Horticultural Science 24: 680-682.

Ammiraju, J.S.S., Dholakia, B.B., Santra, D.K., Singh, H., Lagu, M.D., Tamhankar, S.A. 2001. Cells after Exposure to High Salt and High Osmotic Pressure. Journal of Experimental Botany, 31(121): 571-576.

- Anjum, M.A. 1994. Tissue culture and frost tolerance studies in *Solanum*. PhD thesis. University of Salford, Pakistan.
- 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.
- Baker, C. J. and Mock, M. M. (1994) An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 39, 7–12.
- 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.
- Butcher, D. N., and Ingram, D. S. (1976). *Plant tissue culture*. London: Arnold. , pp. 76-82.
- Castro-Concha, L. A., Escobedo, R. M., and Miranda-Ham, M. L., 2006. Measurement of Cell Viability in *In Vitro* Cultures: In *Plant Cell Culture Protocols* second Edition, Edited by Victor M. Loyola-Vargas, Felipe Vazquez-Flato. Humana Press Totowa, New Jersey, pp. 71-73.
- Chun chang, W., M. Hwa chen and T. Min lee. 1999. 2,3,5- Triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva Fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 207-212.
- Corchete, M. P.; Sanchez, J. M.; Cacho, C.; Moran, M and Tarrag, J. F. 1990. Aardionlide content in cultures derived from root and leaf callus of *Digitalis thapsi* L. *J. Plant Physiol.* Vol 137, pp. 196-200
- Cripen, R. W. and Perrier, J. L. (1974) The use of neutral red and Evans blue for live-dead determinations of marine plankton. *Stain Technol.* 49, 97–104.
- Da Silva, R.F. and Yuffá, A.M. 2006. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. *Catimor*. 9 (5).

- Dale, P.J., Deambrogia, E. 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie 94: 65- 77.
- De Bokx, J.A. and Van der Want , J.P.H.,eds. 1987. Viruses of potatoes and seed-potato production.Pudoc, wageningen, Netherlands.
- De-Gracia, E. and Martinez, S. (1995). Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. *Desiree* from stem nodal sections. Journal of Plant Physiology 145: 526-530.
- Delporte, F., Pretova, A., du Jardin, P. and Watillon, B. 2014. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. Protoplasma, Vol 251 pp.1455 1470.
- Ehsanpour, A.A .and Jones, M.G.K. 2001. plant regeneration from mesophyll protoplast of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Delaware using silver thiosulfate(sts),12:2.
- 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 toPVY and *Pythium aphanidermatum*. Journal of Plant Physiology, 163 : 1321-1332.
- Evans, D.E., Coleman, J.O.D. and Kearns, A. (2003). Role of callus in embryogenesis, organogenesis, and cell culture. In: Plant Cell Culture. Oxford Brookes UniversityOxford, UK Bios Scientific Publishers, pp. 64-65.
- Fallon, K.M. and Phillips, R. (1989). Responses to water stress in adapted and un-adapted carrot cell suspension cultures. Journal of Experimental Botany 40: 681-687.
- Fowler, M. W. (1982) The large scale cultivation of plant cells, in Progress in Industrial Microbiology, Vol 16. (Bull, M. J., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 207–229.

- Fowler, M. W. (1987) Products from plant cells, in Basic Biotechnology (Bu'lok,J. and Kristiansen, B., eds.), Academic Press, London, pp 525–544.
- Frusciante, L., B. Amalia, D. Carputo and P. Ranalli. 1999. Breeding and physiological aspects of potato cultivation in the Mediterranean region. *Potato Rsch.* 42: 265–277.
- 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.
- Gerard, I., Antoine, P., Lepoivre, Ph. and Thonart, Ph. 1991. Uptake kinetics of medium constituents during batch growth of potato cell cultures. *Biotechnology Letters*, 13: 381-384
- Gregorio, G. H. and Felipe, A.V. F. 2006. Growth Measurements, Estimation of Cell Division and Cell Expansion: In *Plant Cell Culture Protocols* second Edited by Victor M.Loyola-Vargas , Felipe Vazquez-Flato. Humana Press Totow ,New Jersey, pp.56-57.
- Gurel.S, Gurel.E, Kaya.Z .(2002). Establishment of Cell Suspension Cultures and Plant Regeneration in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Turk J Bot* 26 (2002),pp.197-205.
- Hou, B.H. and Lin, C.G. (1996) Rapid optimization of electroporation conditions for soybean and tomato suspension cultured cells. *Plant Physiol.* 111(Suppl. 2),166.
- Huang, C. N., Cornejo, M. J., Bush, D. S., and Jones, R. L. (1986) Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma* 135,80–87.
- 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.
- Hulme, J., Higgins, E.S. and Sheild, R. (1992). An efficient genotype-dependent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 161-167.
- Invitrogen. 2002. Groth and maintenance of insect cell lines. Invitrogen lifeTechnologies.versionk, www.invitrogen.com. techservice@invitrogen.com.
- Jayaree, T., Pavan, U., Ramesh, M., Rao, A.V., Jagan. M., Reddy, K. and Sadanandam, A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 13-17.
- 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.
- 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.
- 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.
- Khatun, S. and Flowers, T.J. 1995. The estimation of pollen viability in rice. *Journal of Experimental Botany*, 46(1):151-154.
- Kikuta, Y., Saito, W. and Okazawa, Y.1984. Protoplast culturs of potato: Changes in viability and initiation of cell division, *Plant Tissue Culture Lett.*,1: 18-21.
- King, P. J. (1980). Cell proliferation and growth in suspension cultures. *Int. Rev. Cytol. Supplement* 11A, pp. 25-54.

- Kohlenbach, H. W. (1959) Streckungs-und Teilungswachstum isolierter Mesophyllzellen von *Macleaya cordata* (Wild.) R. Br. Naturwissenschaften 46,116–117.
- 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.
- Kuldybear, M.M., Amerkhanova, M.B. and Dzhakibaeva, G.T. (1995). Effect of phytohormones (kinetin/2, 4.D) on induction of callus tissue growth in tissue culture of potato cultivar Nevskii. Izu. Akad Nauk. Resp. Kaz. Ser. Biol 2: 84-87.
- Kumar, P. S. and V. L. Marthur. 2004. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 78: 267-271.
- Leone, A., Costa, A., Tucci, M. and Grillo. (1994). Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. Physiologia Plantarum 92: 21-30.
- Lindeque, J.M., Vander-Mesch, A., Slabbert, M.M. and Henn, G. (1991). Variation in phenotype and proteins in plants regenerated from cell suspensions of potato cv. BPI. Euphytica 54: 41-44.
- Liu, Q.C., Zhai, H., Lu, D.H., Wang, Y., Zhang, D.P. (1998). An efficient system of embryogenic suspension cultures and plant regeneration in sweet potato. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37:265-270
- 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. 46P.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY.
- Mikula, A., Nidzielski, M., Fiuk, A., Zielinska, M. and Rybczynski, J. J. 2009. TTC test functionality in evaluation of surviving of *Gentiana pema* after cryopreservation. 2:2- 973.

- Muhlbach. HP, Faustmann. O and Sunger.HL. 1983. Conditions for optimal growth of a PSTV_infected potato cell suspension and detection of viroid_complementary longer_than_unit_length RNA in these cells. Plant Molecular Biology (2),pp.239-247.
- Muir, W. H., Hildebrandt, A. C., and Riker, A. J. (1958) The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants. Am. J. Bot. 45, 585–597.
- Muir, W.H., Hildebrandt, A.C., and Riker, A.J. (1954) Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells. Science 119,877–878.
- 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.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium For Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. Plant Physi., 15(1): 473-479.
- Murray, M.G. and Thompson, W. F.1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res., 8: 4321- 4325.
- 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.
- NAPC. 2008. The Syrian Agricultural Trade. GCP/SYR/006/ITA, Damascus.
- 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.
- Orzech, K.A., Burke, J.J., 1988. Heat shock and the protection against metal toxicity in wheat leaves. Plant Cell Environ. 11:711-714.
- Palta, J. P., Levitt J., and Stadelmann, E. J. (1978) Plant viability assay. Cryobiology 15,249–255.

- Pegg D. E. (1989) Viability assays for preserved cells, tissues and organs. *Cryobiology* 26,212–231.
- Petrova, A. and Dedicova, B. (1992). Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from unripe zygotic embryos. *Journal of Plant Physiology* 139: 539-542.
- Pevalek, K. B. and S. Jelaska.1987. Microclonal propagation of *Prunus avium*. *Acta Hort.*, Vol 212 pp.599-601
- Pisum sativum. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78: 267-271.
- Qi, X., Stam, P. and Lindhout, P. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome* 39: 379-394.
- Qureshi, A. and John, I. 1985. Organogenetic callus formation from various potato explants. *Pakistan Journal of Agriculture Research* 6: 271-273.
- 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.
- Sadohara, T. 1993.Studing on the breeing of *Solanum* species by protoplast fusion. Thesis of the Master Degree, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan (In Japanese).
- 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.
- Sajid, Z. 2010. Biochemical Characterization Of *In Vitro* Salt Tolerant Cell Lines And Regenerated Plants Of Potato (*Solanum. tuberosum* L.). PhD thesis. University of the Punjab Lahore, Pakistan.
- Sambrook, J., E. F Fritch,. and T, Maniatus. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Schafer-Menuhr.A, Mix-Wadner.G, Vorlop.KD,2003. Regeneration of plant from cell suspension cultures and encapsulated cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L.vc. clarissa.Landbauforschung Volkenrode 53,pp.53-59.
- Seabrook, J.E.A. and Douglass, L.K. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from range of genotype and ploidy levels. Plant Cell Reports 20: 175-182.
- Seabrook, J.E.A., Douglass, L.K. and Tai-George, C.C. 2001. Segregation for somatic embryogenesis on stem-internode explants from potato seedlings. Plant Cell, Tissueand Organ Culture 65: 69-73.
- Shekhawat GS and PS Naik. 1999. Potato in indi3_ Central Potato Research Institute, Shimla, india.
- Shepard, J.F. and Totten, R.E. (1977). Mesophyll cell protoplasts of potato- isolation, proliferation and plant regeneration. Plant Physiology 60: 313-316.
- 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.
- Shirin, F., Hossain, M., Kabir, M.F., Ray, M. and Sarker, S.R. (2007). Callus induction and plant regeneration from internodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. World Journal of Agricultural Sciences 3: 1-6.
- Skoog, F and Miller. C.O.1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. Vol 11 pp.118-131.
- Smith, B. A., Reider, M. L., and Fletcher, J. S. (1982) Relationship between vital staining and subculture growth during the senescence of plant tissue culture. PlantPhysiol. 70,1228–1230.
- Sopory, S., Jacobsen, E., and Nienzel, G. (1978). Production of mono-haploid embryoids of plantlets in cultures anthers of *Solanum tuberosum*. Plant Science Letter 12: 47-54.

- Steward, N., Martin, R., and Engasser, J. M. (1999) A new methodology for plantcell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Rep.* 19,171–176.
- Street, H.E. (1977). Cell (suspension) cultures - techniques. In *Plant tissue and cell culture*, 2d ed., ed. H. E. Street. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 61-102.
- Su, W. W. (1995) Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50,189–230.
- 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.
- 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.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*,17:6463-6471.
- Taylor, W.J. and West, D.W. 1980. The Use of Evan's Blue Stain to Test the Survival of Plant
- Thomas, E. 1981. plant regeneration from shoot culture derived protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). *plant science let.*,23:81-88.
- Torabi, F., Majad, A. and Ehsanpour, A.A. (2008). Plant regeneration from cell suspension culture of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 778-782.
- Towill, L. E. and Mazur, P. (1975) Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as viability assay for plant tissue cultures. *Can. J. Bot.* 53,1097–1102.

- Trevor A.Thorpe.2006. History of plant Tissue Culture :In Plant Cell Culture Protocols second Edited by Victor M.Loyola-Vargas ,Felipe Vazquez-Flato. Humana Press Totowa, New Jersey,pp.11-19.
- Trigiano, R. N and Gray, D. J. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises . CRC Press LLC,USA, pp.44-60
- Vanková, R., Kuncová, G., Opatrná, J., Süßenbeková, H., Gaudinová, A., and Vanek, T. (2001) Two-dimensional fluorescence spectroscopy—a new tool for the determination of plant cell viability. Plant Cell Rep. 20,41–47.
- Vargas, T.E., De-Garcia, E. and Oropeza, M. (2005). Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. Journal of Plant Physiology 162: 449-456.
- Vasil, I.K. and Vasil, V. 1986. Regeneration in cereals and other grass species. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant (Vasil, I.K. ed.), Academic Press, New York. p. 121-150.
- Vikrant, S. and Rashid, A. 2003. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4D pulse-treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. Biol. Plant, Vol 46 pp. 297-300.
- 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.
- 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.
- Wang, D. and Zhang, N. (2002). Studies on the single cell culture and plant regeneration of potato. In: High technology and potato industry. Chen, Y and Qu, D. (Eds), pp. 1-9.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W.1995. DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Inc., London.

- 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
- Wildholm, J. M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol. 47,189–194.
- 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.
- XLSTAT. 2014. <https://www.xlstat.com/en>.
- Yasmin, S., Nasiruddin, K.M., Begum, R. and Talukder. S.K. (2003). Regeneration and establishment of potato plantlet through callus formation with BAP and NAA.Asian Journal of Plant Sciences 2: 936-940.
- Young, Iris (1990). Justice and the politics of difference. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. ISBN 9780691023151
- 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
- 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.
- Zel, J., Mlakar, M.M., Vilhar, B., Grill, D. and Guttenberger, H. (1999). The efficient regeneration of the potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Igor *in vitro*. Special issue: 2nd Slovenian symposium on plant physiology with international participation, Gozd Martuljek, Slovenia, September 30-October 2. 1998. Phyton (Horn) 39: 277-282.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176–183.

Abstract

This research was carried out in the laboratories of The National Commission for Biotechnology (NCBT) and The Faculty of Agriculture, Damascus University (Damascus- Syria) during the years 2015-2016. It aimed to culture and regenerate cellular suspensions of two 4N potato cultivars *Solanum tuberosum* L. var Amarin and *Solanum tuberosum* L. var Challenger, which were locally certified in 2013. Genetic variations were evaluated on organic callus formed from cellular suspensions using ISSR.

Callus of both cultivars (Amarin and Challenger) was initiated starting with two sources of explants (leaves and internodes) using Murashig and Skooge (MS) medium supplemented with different concentrations of the auxin 2,4-dechlorophenoxy acetic acid (2,4-D). The best concentrations of 2,4-D was 3 mg/l, for callus initiation of cultivar Amarin 96% and 92% from Leaves and Internodes respectively, and 92% of cultivar Challenger from both explants.

Cell suspensions were cultured from callus into liquid medium $\frac{1}{2}$ MS containing 3 mg/l 2,4-D. Some growth parameters (cellular density, mitotic index, and cell viability) were studied. Cell suspensions of both cultivars reached stability phase in the third week of culturing.

Cellular density of cell suspensions has increased significantly in the cultivar Amarin in the third and fourth weeks, while it increased gradually in the cultivar Challenger. Division ratios of internodes-cellular suspensions in the cultivar Amarin were higher comparing with those of leaves, while no-significant differences were observed in the cultivar Challenger. Cell viability of the cell suspensions of the cultivar Amarin was higher in the third and fourth weeks comparing with the Challenger cultivar.

Different concentrations of growth regulators (6- Benzyl amino purin (BAP) and Zeatin (Z)) were used in order to regenerate cell suspensions, and the highest

percentage of the formed callus from cellular suspensions of both cultivars was obtained using 1.75 mg / l of BAP. It was observed that Z had less effectiveness than BAP in the regeneration of callus from the cellular suspensions; cellular suspensions varied in their responds to the regeneration in the presence of Z, that the optimal callus regeneration was obtained using 1.5 mg/l Z starting from leaves and internodes cellular suspensions in Amarin cultivar and from leaves cellular suspensions in Challenger cultivar.

The effect of the explant source (leaves or internodes) on the genetic variations among mother plants and organic callus formed from cellular suspensions was the same in Amarin cultivar using BAP or Z in the regeneration medium; while in the cultivar Challenger genetic variations among mother plants and organic callus was higher starting with leaves comparing with internodes using Z in the regeneration medium.

Genetic variation in both studied cultivars (Amarin and Challenger) and the using BAP in the regeneration medium was higher comparing with it using Z.

Key words: callus, cellular suspensions, genetic variation, potato , 2,4-D, BAP, Z, ISSR,.