دراسة إحداث الطفرات في نباتات الشيح البابونج والإقحوان

رسالة مقدمة من:

عبدالله حسن عبدالله حسن

بكالوريوس العلوم الزراعية (بساتين) - كلية الزراعة - جامعة الفيوم ٢٠١٣

كجزء من متطلبات الحصول علي درجة الماجستير في العلوم الزراعية

(بساتين – زينة)

قسم البساتين

كلية الزراعة

جامعة الفيوم

2019

دراسة إحداث الطفرات في نباتات الشيح البابونج والإقحوان

رسالة مقدمة من:

عبدالله حسن عبدالله حسن

كجزء من متطلبات الحصول علي درجة الماجستير في العلوم الزراعية (بساتين – زينة)

لجنة المناقشة والحكم

أ.د./ إمام محمد صابر نوفل

أستاذ نباتات الزينة وتنسيق الحدائق المتفرغ بكلية الزراعة – جامعة كفر الشيخ

التوقيع.....

أ.د./ ذكي أحمد عطية الفقي

أستاذ الوراثة المتفرغ بكلية الزراعة - جامعة الفيوم

التوقيع.....

أ.د./ شكرى محمود سليم

أستاذ نباتات الزينة والنباتات الطبية والعطرية المتفرغ بكلية الزراعة – جامعة الفيوم

التوقيع.....

د. / أحمد عبدالفتاح محمد يس

أستاذ الوراثة المساعد بكلية الزراعة – جامعة الفيوم

التوقيع.....

التاريخ: / / 2109

دراسة إحداث الطفرات في نباتات الشيح البابونج والإقحوان

رسالة مقدمة من:

عبدالله حسن عبدالله حسن

كجزء من متطلبات الحصول علي درجة الماجستير في العلوم الزراعية (بساتين – زينة)

لجنة الإشراف العلمي:

أ.د./ شكرى محمود سليم

أستاذ الزينة والنباتات الطبية والعطرية المتفرغ – قسم البساتين - كلية الزراعة – جامعة الفيوم

التوقيع.....

أ.د./ إبتسام محمد محمد عبدإللاه

أستاذ الزينة والنباتات الطبية والعطرية - قسم البساتين - كلية الزراعة – جامعة الفيوم

د. / أحمد عبدالفتاح محمد يس

أستاذ الوراثة المساعد – قسم الوراثة - كلية الزراعة – جامعة الفيوم

التوقيع.....

التاريخ: / / 2019

<u>الملخص العربى</u>

أجريت هذه الدراسة خلال ثلاث مواسم وهي (٢٠١٥/٢٠١٦ ، ٢٠١٦/٢٠١٧ ، ٢٠١٧/٢٠١٨) بمزرعة خاصة بمحافظة بني سويف. وتمت الدراسة علي نظام تجربتين وهما

التجربة الأولي:

وفيها تم دراسة تأثير التركيزات المختلفة من الكولشيسن (٠,٠، ٠,٠٢٥، ٠,٠٥، ٠,١، ٠,٢، ٠,٤ ، ٠,٨)علي نسبة إنبات بذور كل من نبات الشيح البابونج والأقحوان. حيث تم نقع بذور كلا النباتين في التركيزات المختلفة من الكولشيسن علي درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ونصف وكل معاملة من النقع إحتوت علي ٤ مكررات وكل مكرر به ٢٥ بذرة أي أن كل معاملة بها ١٠٠ بذرة.

التجربة الثانية:

وكان الهدف من العمل هو دراسة تأثير التركيزات المختلفة من الكولشيسين (٠,٠، ٠,٠٢٥، ٠,٠٥، ٠,١، ٠,٢، ٠,٤ ، ٠,٨) علي الصفات المورفولوجية من (عدد الأفرع ، إرتفاع النبات ، وعدد الأزهار ، وزن الأزهار الطازج ، وزن الأزهار جاف) لكل من نباتي الشيح البابونج والأقحوان والصفات الكيميائية من (تقدير نسبة الزيت في أزهار البابونج ، ونسبة صبغة البيتا كاروتين في أزهار الكلانديولا ، تقدير نسبة الكربوهيدرات لكلا النباتين) خلال الثلاث مواسم السابقة. حيث تمت المعاملة بالنقع (وضع قطعة من القطن المبللة بالمحلول بالتركيزات السابقة علي القمة النامية للنبات حتي تمام جفافها) وتمت المعاملة علي مرحلتين من عمر النبات وهما مرحلة الشتلات (أي بعد ٥٠ يوم من زراعة البذور) ومرحلة بداية تكون البراعم الزهرية (بعد ٨٠ يوم من زراعة البذور).

عزل الحمض النووي DNA

تم إستخلاص المادة الوراثية (DNA) من الأوراق الطازجة لكلا النباتين (اوراق صغيرة من كل معاملة) بإستخدام مادة (CTAB) ستيل ميثيل أمونيوم بروميد.

التكبير العشوائي للمادة الوراثية (تفاعل البلمرة المتسلسل):

تم إستخدام إختبارتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من خلال عشرة بادئات عشوائية خلال الموسم الأول وهي (OPA 1, OPA2 , OPA 3, OPA 4, OPA 5, OPA 6, OPA 7, OPA 8, OPA 9, OPA 10)

و١٦ بادئ خلال الموسم الثاني ((OPA 1, OPA2 , OPA 3, OPA 4, OPA 5, OPA 6, OPA 7, OPA 8, OPA 9, OPA 10, C1, C2, C3, C6, C7, C8)

حيث تم اجراء بصمة وراثية للDNA باستخدام RAPD-PCR لتحديد درجة التشابة والأختلاف بين المعاملات المختلفة لكلا النباتين.

تصميم التجربة والتحليل الأحصائي

تم إستخدام نظام القطاعات تامة العشوائية وكل معاملة من المعاملات السابقة تتكون من ٣ مكررات وكل مكرر يحتوي علي ١٠ نباتات.

ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها تحت العناوين الأتية:

تأثير الكولشيسين علي الشيح البابونج

١- نسبة الإنبات:

أوضحت النتائج أن البذور المعاملة بالتركيزات العالية إنخفضت نسبة إنباتها عندما قورنت بالمعاملة بالتركيزات المنخفضة حيث أنة تم تسجيل أعلي نسبة إنبات (٨٨%) كانت من البذر المعاملة بالنقع في التركيز ٠,٠٢٥% أي أنه كلما زاد تركيز الكولشيسين كلما إنخفضت نسبة الإنبات.

٢- الصفات المورفولوجية:

أ- إرتفاع النبات:

من دراسة النتائج تبين أن التركيزات المرتفعة من الكولشيسين أثرت عكسيا علي إرتفاع النبات حيث سجلت أكبر إرتفاع للنباتات كان (٦٧,٠٠، ٦٣,٦٧ ، ٧٢,٤٢) للنباتات الغير معاملة بالكولشيسين أما أقل إرتفاع للنباتات (٥٠,٧٥، ٥٠,٧٥ ، ٤٨,٣٣) كان للنباتات المعاملة بالتركيز (٠,٨%) .

ب- عدد الأفرع علي الساق الرئيسي :

أوضحت النتائج أن جميع النباتات المعاملة بالكولشيسين سجلت عدد أفرع أكبر مقارنة بالباتات الغير معاملة أيضا أكبر عدد من الأفرع وجدت في النباتات المعاملة بالتركيز(٠,٠٥%)

ت- عدد الأزهار للنبات:

من ملاحظة النتائج وجد أ النباتات المعاملة بالكولشيسين أنتجت عدد أزهار أكبر مقارنة مع النباتات الغير معاملة خلال الثلاث مواسم وأكبر عدد من الأزهار(٣٨١، ٤٦٠، ٤٤٤) لوحظ في النباتات المعاملة بالتركيز بالتركيز(٠,٠٥%) مقارنة بالتركيزات الأخري.

ث- وزن الأزهار طازج:

الدراسة أوضحت أن النباتات المعاملة بالكولشيسين أفضل من الغير معاملة حيث زاد وزن الأزهار الطازج في النباتات المعاملة عن النباتات الغير معاملة به وأيضا تبين أن التركيز (٠,٠٥%) حقق أكبر وزن للأزهار عن المعاملات الأخري.

ج- وزن الأزهار جاف:

أوضحت النتائج وجود فروق معنوية بين النباتات المعاملة بالكولشيسين وغير المعاملة حيث وجد أكبر وزن جاف للأزهار كان خلال المعاملة (٠,٠٥%) بينما أقل وزن كان للنباتات الغير معاملة .

٣- المكونات الكيميائية:

أ- الكربوهيدرات الكلية:

من النتائج المتحصل عليها تبين أن النباتات المعاملة بالتركيزات (٠,٠٥% ، ٠,١% ، ٠,٢%) أعطت محتوي مرتفع من الكربوهيدرات الكلية مقارنة بالتركيزات الأخري والكنترول وأعلي تركيز كان مع المعاملة (٠,٠٥%).

ب- نسبة الزيت:

أوضحت الدراسة أن محتوي الأزهار من الزيت الأساسي إزداد في المعاملة (٠,٠٥%) خلال الثلاث مواسم وسجلت النتائج وكانت (٠,٧٠، ٠,٧٠، ٠,٧١ %).

٤- تفاعل البلمرة المتسلسل

أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستتخدام تقنية التكبير العشوائي لمناطق متباينة من الحمض النووي (RAPD-PCR) وجود تباين جيني على المستوى الجزيئي نتيجة لتأثير الكولشيسين حيث اختفت بعض الحزم وظهرت حزم جديدة.

أيضا تراوح العدد الإجمالي للحزم التي تم الحصول عليها من ٦٥ إلى ٩٤ في البابونج وتراوحت نسبة تعدد الأشكال الممظهرية من ٦٧% إلى ٨٠%.

تراوح متوسط عدد الحزم من ٦,٥ إلى ٩,٤ لكل بادئ في البابونج .

خضعت البيانات التي تم الحصول عليها من علامات RAPD-PCR لتحليل المجموعات لفهم تنوعه اباستخدام برنامج NTSYs لإجراء تحليل شجرة القرابة dendrogram والتي اظهرت المعاملات دائما في مجموعتين.

ولدت المعاملة بالكولشيسين كمية كبيرة من التباين وصلت الي ٣٥%. هنا ، كما حصلنا على كمية كافية من التباين للصفات الإنتاجية المختلفة وتم تحديد عدد من التركيزات الفائقة في كل نبات والتي يمكن استخدامها بشكل أكبر في انتاج أنماط وراثية متفوقة في الصفات المرغوبة.

تأثير الكولشيسين علي نبات الأقحوان:

١- نسبة الإنبات:

النتائج أوضحت أن معاملة البذور بالتركيزات العالية تقلل من نسبة الإنبات بينما بالمعاملة بالتركيزات المنخفضة بها نسبة إنبات أعلي حيث أنة تم تسجيل أعلي نسبة إنبات (٨٨% ، ٩٢%) كانت من البذر المعاملة بالنقع في التركيزات (٠,٠٢٥% ، ٠,٠ %) ووصلت نسبة الإنبات إلي (١٢%) في التركيز (٠,٨%) أي أنه كلما زاد تركيز الكولشيسين كلما إنخفضت نسبة الإنبات.

٢- القياسات المورفولوجية:

أ- إرتفاع النبات:

إوضحت النتائج المتحصل أن إرتفاع النبات ينخفض تدريجيا مع التركيزات المرتفعة من الكولشيسين حيث سجلت أكبر إرتفاع للنباتات كان (٦٠,١٧، ٦٠,٥٨،٥٦,١٧) للنباتات الغير معاملة بالكولشيسين أما أقل إرتفاع للنباتات (٤٠,٨٣، ٤٣,٧١ ٤٥,٨٨) كان للنباتات المعاملة بالتركيز (٠,٨%) .

ب- عدد الأفرع علي الساق الرئيسي :

أوضحت النتائج أن جميع النباتات المعاملة بالكولشيسين سجلت عدد أفرع أكبر مقارنة بالباتات الغير معاملة أيضا أكبر عدد من الأفرع وجدت في النباتات المعاملة بالتركيز(٠,٠٥%)

ت- عدد الأزهار للنبات:

من ملاحظة النتائج وجد أ النباتات المعاملة بالكولشيسين أنتجت عدد أزهار أكبر مقارنة مع النباتات الغير معاملة خلال الثلاث مواسم وسجلت أفضل معاملة بالكولشيسين كان للتركيز (٠,٠٥%) مقارنة بالتركيزات الأخري.

ث- قطر الزهرة:

أوضحت النتائج أن التركيزات المختلفة من الكولشيسين أثرت بالإيجاب علي قطر الزهرة عن النباتات الغير معاملة وكان أكبر قطر للأزهار (٨,٠٤ , ٨,٢١, ٨,٠٩) كان للتركيز (٠,٠٥%) عن المعاملات الأخري.

ج- وزن الأزهار طازج:

تبين من الدراسة أن معاملة النباتات بالكولشيسين زادت من وزن الأزهار الطازج عن النباتات الغير معاملة به وأيضا تبين أن التركيز (٠,٠٥%) حقق أكبر وزن للزهرة (٨,٤٠ ، ٧,٥٥ ، ٨,٣١ جم) عن المعاملات الأخري.

ح- وزن الأزهار جاف:

أوضحت الدراسة وجود فروق معنوية بين النباتات المعاملة بالكولشيسين وغير المعاملة حيث وجد أكبر وزن جاف للزهرة كان (١,٣٦، ١,٣٣، ١,٢٤) خلال المعاملة (٠,٠٥%) بينما أقل وزن جاف للزهرة كان في النباتات الغير معاملة .

٣- المكونات الكيميائية:

أ- الكربوهيدرات الكلية:

من النتائج المتحصل عليها تبين أن النباتات المعاملة بالتركيزات (٠,٠٥% ، ٠,١%) أعطت محتوي مرتفع من الكربوهيدرات الكلية مقارنة بالتركيزات الأخري والكنترول وأعلي تركيز كان مع المعاملة (٠,٠٥%) وكانت أعلي نسبة الكربوهيدرات (١٤,٠٧، ١٣,٩٤،١٤,٠٠).

ب- نسبة صبغة البيتا كاروتين:

بينت الدراسة أن أكبرمحتوي الأزهار من صبغة البيتا كاروتين كان في التركيز (٠,٠٥%) حيث كانت أكبر نسبة له (٠,٤٤ ، ٠,٤٥ ، ٠,٤٧ %) خلال الثلاث مواسم .

٤- تفاعل البلمرة المتسلسل

تقييم التنوع الجيني والثبات فيها باستخدام تقنية RAPD لتأكيد وجود تباين جيني على المستوى الجزيئي نتيجة لتأثير الكولشيسين.

الحمض النووي الجيني المتسخلص من أوراق النباتات للمعاملات المختلفة تم تضخيمه باستخدام بادئات RAPD مختلفة.

تراوح العدد الإجمالي للحزم التي تم الحصول عليها من ٢٨ إلى ٤٤ حزمة في الأقحوان وتراوحت نسبة تعدد الأشكال الممظهرية من ٥٧% إلى ٧٠% في الأقحوان.

تراوح متوسط عدد الحزم من ٧ إلى ٧,٧٥ حزمة لكل بادئ في الأقحوان.

خضعت البيانات التي تم الحصول عليها من علامات RAPD-PCR لتحليل المجموعات لفهم تنوعه اباستخدام برنامج NTSYs لإجراء تحليل شجرة القرابة dendrogram والتي اظهرت المعاملات دائما في مجموعتين.
ولدت المعاملة بالكولشيسين كمية كبيرة من التباين تصل الي ٣٥% تقريبا. هنا ، كما حصلنا على كمية كافية من التباين للصفات الإنتاجية المختلفة وتم تحديد عدد من التركيزات الفائقة في كل نبات يمكن استخدامها بشكل أكبر في انتاج أنماط وراثية متفوقة في الصفات المرغوبة.

التوصيات

١- يمكن استخدام التركيز المنخفض من الكولشيسين (٠,٠٥%) في معاملة نباتات البابونج والاقحوان لزيادة الانتاجية حيث ادت في الدراسة إلي زيادة معنوية في معظم الصفات المدروسة.
٢- يجب المحافظة علي النباتات المتفوقة في الصفات المرغوبة لاستخدامها في برامج التربية والتحسين الوراثي.
٣- الدراسات الجزيئية باستخدم بادئات RAPD أظهرت مستوى عالٍ من تعدد الأشكال المظهرية مما يشير إلى إمكانات هذه الواسمات للكشف عن الطفرات.