التحليل الجزيئي والبروتيني لتحمل الملوحة في اصناف الليمون الناتجة من الاكثار المعملي الدقيق

عبد المحسن بن رده بن عبيد السيد

اشراف

د. مجدي علي احمد موسي

د. احمد عبد الله سعيد باخشوين

المستخلص العربي

إهتمت هذه الدراسة بالإكثار المعملي الدقيق باستخدام القطع الساقية الصغيرة وعمل البصمة الوراثية لأربعة اصناف من الليمون. أجريت هذه الدراسة خلال الفترة من ٢٠١٢ – ٢٠١٤ في معمل زراعة الانسجة النباتية ومعمل التقنية الحيوية ، قسم زراعة المناطق الجافة ، كلية الارصاد والبيئة وزراعة المناطق الجافة ، جامعة الملك عبد العزيز. وتم إجراء خمس تجارب متكاملة حيث اهتمت التجربة الاولي بدراسة تأثير منظمات النمو علي الاكثار المعملي الدقيق للقطع الساقية الدقيقة من اربعة اصناف من الليمون. والتجربة الثانية اهتمت بدراسة إمكانية مضاعفة عدد وطول السيقان الناتجة من الاكثار الدقيق باستخدام توليفات مختلفة من منظمات النمو. والتجربة الثالثة اهتمت بإمكانية التجذير للسيقان الناتجة من الاكثار الدقيق باستخدام توليفات مختلفة من الأوكسين. التجربة الرابعة اهتمت بدراسة استجابة اصناف الليمون المكاثرة عن طريق مزارع الانسجة لتركيزات مختلفة من الملوحة. اما التجربة الخامسة فأهتمت بعمل البصمة والوراثية ودراسة الاختلافات الوراثية بين اصناف الليمون باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

استخدم التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Design) في تجارب الاكثار الدقيق لأصناف الليمون. اشارت نتائج التجربة الاولي إلي وجود اختلافات معنوية بين الاصناف

وتركيزات منظمات النمو والتفاعل بينهما لجميع الصفات المدروسة. حيث اظهرت النتائج ان التركيزات المنخفضة من Kin ، BAP وتوليفاتهما مع 2,4- D ادت إلي الانبثاق المبكر لبراعم جميع اصناف الليمون محل الدراسة. كما اشارت النتائج إلي عدم ملاحظة أي سويقات ميتة بعد الانبثاق لأصناف الليمون "شعيري" ، "الن يوريكا" و "بنزهير" علي البيئات المغذية التي احتوت علي تركيزات منخفضة من Kin ، BAP وتوليفاتهما مع 2,4- D. انتج الصنف "شهري" اطول السويقات (٢٥،٤سم) علي البيئة المغذية المحتوية علي ٠،٥ ملجم/لتر من BAP + ١ملجم/لتر 2,4- D . كما اشارت النتائج ان الصنف "الن يوريكا" انتج اكبر عدد من الاوراق/سويقة علي البيئة المغذية المحتوية علي ٠،٥ ملجم/لتر BAP + ١ ملجم/لتر 2,4- D . فيما يخص تجربة مضاعفة عدد السويقات واستطالتها ، اشارت النتائج إلي ان الصنف " الن يوريكا" والصنف "شعيري" قد كونا اكبر عدد من السيقان علي البيئة المغذية المحتوية علي تركيزات منخفضة من BAP و Kin وخصوصا البيئة المغذية المحتوية علي ٠،٥ و ١ ملجم/لتر BAP . وكون الصنف "شعيري" طول السيقان علي البيئات المغذية المحتوية علي ٠،٥ ملجم/لتر BAP (٣٩,٨٧ ملم) ، ٢ ملجم/لتر BAP (٣٨،٨٣ملم). اضافة BAP إلي البيئة المغذية بتركيز ١ملجم/لتر زود عدد الاوراق /سويقة للصنفين "الن يوريكا" و " بنزهير". فيما يخص تجربة التجذير فقد اشارت النتائج إلي وجود اختلافات معنوية بين اصناف الليمون وكذلك بين معاملات منظمات النمو الا ان التفاعل بينهما كان غير معنويا. وقد اظهرت النتائج ان سيقان الصنف "الن يوريكا" كونت عدد من الجذور تزيد بنسب ٢٧،٢١% ، ٤٣،٨٤& و ٧٥،٧٢% عن الاصناف "شعيري" ، "شهري" و " بنزهير" ، علي التوالي. اضافة الاوكسين NAA عند تركيز ٠،٥ملجم/لتر مع الاوكسين IBA عند تركيز ١ملجم/لتر قد حفز تكوين الجذور بنسبة تزيد عن باقي المعاملات بمقدار ٣٥،٤٢%. سجل الصنف " الن يوركيا" اكبر عدد من الجذور/سويقة (٦١،٧) تلاه الصنف "شعيري (٠,٩٠٩) ثم الصنف "بنزهير" (٠،٦٩٧). سجل الصنف "شعيري" اطول الجذور (١٢،٦٩مم) تلاه الصنف "الن يوريكا" بطول جذور قدره (١١،٣٠مم). اضافة NAA بتركيز ٠،٥ ملجم/لتر و IBA بتركيز ١ ملجم/لتر إلي البيئة المغذية انتج اطول جذور (٢١،٤٣ملم). فيما يخص تجربة الملوحة فقد اشارت النتائج إلي ان جميع اصناف الليمون المستخدمة في الدراسة اعطت نتائج عالية عند زراعتها علي البيئات المغذية التي لم يضاف

اليها أي تركيزات ملوحة. كما اشارت النتائج إلي ان جميع الاصناف قد تأثرت بشكل معنوي جدا علي تركيزات الملوحة المرتفعة (٠،٧ % و ٠،٩%). الصنف "الن يوريكا" و " بنزهير" سجلا اعلي القيم فيما يخص صفات عدد السويقات المتكونة/سويقة ، عدد الاوراق/سويقة ، متوسط طول السويقة (ملم) و طول السلامية (مم) وذلك علي البيئات المغذية المحتوية علي تركيزات ملوحة ٠،١ % – ٠،٥ %. الاصناف "الن يوريكا" و "بنزهير" سجلت اكبر عدد من السويقات الغير متأثرة بالملوحة علي بيئة الشاهد (بدون تركيزات ملوحة) والبيئات المغذية المحتوية علي تركيزات منخفضة من الملوحة (٠،١% و ٠،٣%). اصناف الليمون " شعيري" و "شهري" سجلت اعلي عدد من السويقات التي ظهرت عليها اضرار بسيطة نتيجة تركيزات الملوحة، واضرار متوسطة نتيجة تركيزات الملوحة و ضرر بالغ اعقبه الموت نتيجة تركيزات الملوحة. هذه الاصناف صنفت علي انها حساسة للملوحة. اشارت نتائج تجربة البصمة الوراثية لأصناف الليمون موضع الدراسة إلي ان ٣٥ بادئ وراثي من اصل ٦٠ بادئ عشوائي وراثي تم اختبارها أعطت مجموع قدره ١٢٨ باند (معلوماتي وغير معلوماتي) بمتوسط قدره ٣،٦٥ باند/بادئ وراثي. كما اشارت النتائج ايضا ان ١١ بادئ وراثي من اصل ٣٥ بادئ وراثي اظهرت نتائج جيدة واعطت عدد ٢٢ باند معلوماتي. اشارت النتائج إلي ان صنف الليمون "الن يوريكا" قد تم تمييزه من خلال عدد ١٦ موقع رائي , والصنف " بنزهير" قد تم تمييزه بعدد ١٦ موقع وراثي ، والصنف "شهري" بعدد ١٠ مواقع وراثية و الصنف "شعيري" بعدد ١٦ موقع وراثي. الموقع الوراثي OPT-03-400 مرتبط تماما بالأصناف "بنزهير" و ""شعيري" لكنه لم يميز الاصناف "الن يوريكا" و "شهري". الموقع الوراثي OPT-06-400 هو مميز للأصناف "شهري" و " شعيري" . الموقع الوراثي OPT-06-450 مرتبط تماما بالصنف "بنزهير" ولذلك يعد من المعلمات الوراثية المهمة جدا ويعتبر موقع وراثي مميز للأشجار الليمون وخصوصا اشجار الليمون للصنف " بنزهير. وفيما يخص دراسة درجة الشبهة والقرابة الوراثية بين اصناف الليمون موضع الدراسة فقد اشارت النتائج إلي ان اقرب الاصناف شبها وراثيا هو الصنف " بنزهير" والصنف "شهري" (٠،١٥٣) ، الصنف "شعيري" و الصنف "بنزهير" (٠،٢١٨) بينما كانت درجة الشبهة والقرابة بين "شعيري" و "شهري" (٠،٢١٣).

Molecular and Protein Analysis for the Identification of Salt Tolerance of the *In-vitro* Propagated Lemon Genotypes

AbdulMohsin Radah Obead Al Sayed

Supervised By

Dr. Magdi Ali Ahmed Mousa

Dr. Ahmed Abdullah Bakhashwain

Abstract

The presented study considered the *in vitro* propagation using nodal segments and DNA fingerprinting of four lemon culttivars. The experiments were conducted during 2012-2014 in the Lab of Plant Tissue Culture and the Lab of Plant Biotechnology, Department of Arid Land Agriculture, Faculty of Meteorology, Environment and Arid Land Agriculture, King Abdulaziz University. The first experiment considered the effects of growth regulators on *in vitro* nodal segments of the lemon cultivars. The second experiment investigated the impacts of adding different growth regulators combinations at low levels to the culture medium for enhancing shoots multiplications and elongations. The third experiment investigated root induction and roots formation of the lemon formed plantlets. The fourth experiment focused on *in vitro* secreening of lemon cultivars to salinity tolerance. The fifth experiment focused on the DNA fingerprinting and possibly genetic diversity of the four tested lemon cultivars using RAPD-based PCR technique. The experiments of *in vitro* culture of Lemon were laid out in Completely Randomized Design (CRD) using 4 replicates. The results of first experiment revealed obvious significant differences due to effects of

lemon cultivars, plant growth regulators combinations and their interactions on *in vitro* nodal segments of lemon at all measured traits. The results illustrated that the low concentrations of Kin and BAP alone or in combination with 2,4-D caused early buds sprouting of all lemon cultivars. The lemon cultivars 'Shehri' and 'Aln-Eureka' revealed highest percentages of sprouted buds on culture medium supplemented with a combinations of BAP at high concentrations and 2,4-D at low concentrations. It was observed no dead shootlets of 'Shaary', 'Aln-Eurka' and 'Banziher'on culture medium contained low concentrations of Kin, BAP alone or in combinations with 2,4-D. The tallest primary shoots were produced by 'Shehri' (25.4mm) on cultutre medium contained BAP at 0.5 mgl^{-1}+2,4-D at $1mgl^{-1}$. The lemon cultivar 'Aln-Eureka' produced the maxiumum number of leaves/shoot on culture medium contained BAP $0.5mgl^{-1}$ + 2,4-D at $1mgl^{-1}$. For shoot multiplication, the results showed that all explants of 'Aln-Eureka' developed shoots on culture medium supplemented with Kin $1mgl^{-1}$ and BAP at $0.5mgl^{-1}$ and $1mgl^{-1}$. Adding BAP at $0.5mgl^{-1}$ and $1mgl^{-1}$ to the culture medium enhanced shoots formation of the lemon cultivar 'Aln-Eureka' and 'Shaary'. The greatest lengths of formed shoots were produced by 'Shaary' explants on culture medium supplimented with BAP at $0.5mgl^{-1}$ (39.87mm), $2mgl^{-1}$ (38.83mm). Adding BAP at $0.5mgl^{-1}$ to the culture medium increased number of formed leaves/shoot for 'Aln-Eureka' and 'Shaary', and BAP at 1mgl-1 increased number of leaves/shoots of 'Aln-Eureka' and 'Banziher'. Shoots of 'Aln-Eureka' formed roots higher by 27.21%, 43.84% and 75.72% than 'Shaary', 'Shehriu' and 'Banzahir', respectively. Adding a combination of NAA at $0.5mgl^{-1}$ and IBA at $1mgl^{-1}$ estimulated higher percentages of lemon shoots to form roots (35.42%) followed by IBA at $1mgl^{-1}$ (33.33%). The cultivar 'Aln-Eureka' formed highest number of roots/shoot (1.76) followed by 'Shaary' (0.909), 'Shehri' (0.818) and 'Banziher' (0.697). The presence of NAA at $0.5mgl^{-1}$ in the culture medium significantly increased number of roots/shoot (2.55). 'Shaary' with 12.69 mm and 'Aln-Eureka' with 11.30mm produced the highest root lengths. The combination of NAA at $0.5mgl^{-1}$ and IBA at $1mgl^{-1}$ produced the highest length of roots (21.43mm). Regarding salinity tolerance the results showed that all tested cultivars revealed highest performance on medium without salt treatments (control) and lowest

performance on culture medium with 0.7% and 0.9% NaCl. The cultivar ‘Banzahir’ and ‘Aln Eureka” registerd highest no. of developed shoots, no. of leaves/shoot, average shoot length (mm) and maxiumum internode length on cultutre medium with various NaCl concentrations especially 0.1% and 0.3%. The cultivar ‘Baziher’ and ‘Aln-Eureka’ revealed highest performance under various treamtemnts of NaCl and considered to be salt tolerance. ‘Banzaiher and ‘Aln Eureka’ regestered highest no. of shoots without salt stress symptoms with control treatments and 0.1% - 0.9% treatments of NaCl. The cultivars ‘Shehri’ and ‘Shaary’ recoreded high values of number of soots with mild chronics, medium chlornic and intense damaged on all culture medium with 0.1%-0.9% NaCl concentrations. These cultivars considered as salt sensitive. About the identification of lemon cultivars using RAPD markers, the results revealed that 35 (58.33%) reproducible RAPD primers out of 60 produced a total of 128 bands (monomorphic and polymorphic bands) with an average 3.65 bands/primer. Out of the 35 RAPD primers 11 were informative and produced a total of 51 bands where 29 were monomorphic (56.86%) and 22 (44.00%) polymorphic. The lemon cultivar ‘Aln-Eureka’ was identified by 14 RAPD loci, ‘Banziher’ by 16 RAPD loci, ‘Shehri’ by 10 RAPD loci and ‘Shaary’ by 16 RAPD loci. The RAPD marker OPT-03-400 was tightly linked to the lemon cultivars ‘Banziher’ and ‘Shaary’, while the marker not identified ‘Alin-Eurka’ and ‘Shehri’. OPT-06-400 was marker specific for ‘Shehri’ and ‘Shaary’, while OPT-06-450 was tightly linked to ‘Banziher’ and considered as marker specific for the lemon cultivar ‘Banziher’. Less similarity was observed between ‘Alin-Eureka’ and ‘Banziher’ (0.066), ‘Shehri’ (0.083) and ‘Shaary (0.066). High similarities were found between ‘Shehri’ and ‘Shaary’ (0.231), Banziher’ and ‘Shaary’ (0.218) and between ‘Banziher’ and ‘Shehri’ (0.153)