Detection of the genetic stability for the tissue tomato plants by using RAPD technique

تحديد الثبات الوراثي لنباتات الطماطة النسيجية باستخدام تقانة RAPD

فرقد محمد كاظم الدباغ — وزارة الزراعة
محمد شهاب حمد — كلية الزراعة/جامعة بغداد
صالح محسن بدر — وزارة الزراعة

المستخلص:

استخدمت تقانة مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة RAPD)DNA) والمعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا(PCR) Poly Chain Reaction)) للتأكد من الثبات الوراثي لهجيني الطماطة(الشروق و GS-12) المنتجة من زراعة الأنسجة النباتية. اختيرت النباتات النسيجية النامية من البذور الصناعية التي تضم الأجنة الجسمية وبشكل عشوائي لثلاث معاملات فضلا عن معاملة المقارنة المتضمنة نباتات نامية من بذور طبيعية مزروعة على ورق ترشيح معقم ومرطب بالماء المقطر المعقم. أجريت اختبارات البصمة الوراثية باستخدام مؤشرات RAPD، اذ استخلص الدنا من عينات الاوراق الفتية الخضراء للنباتات النسيجية والنباتات الام ولهجيني الدراسة، وبعد تحديد الظروف المثلى لتفاعلات RAPD، تم الحصول على نتائج واضحة ومتعددة باستخدام البادئ OPC-O3 المنتخب من اصل خمس بادئات وتم الحصول على تطابق تام في نمط توزيع الحزم ولهجيني الطماطة المدروسين، وعليه يتضح ان مؤشرات RAPD هي من مؤشرات الدنا السهلة والسريعة في مجال تحديد مدى التطابق الوراثي للنباتات الناتجة من زراعة الانسجة النباتية.

Abstract:

The Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers were used to confirm the genetic stability for two hybrids of tomato: Shorouk and GS-12 produced from plant tissue culture which produced from synthetic seeds were selected and randomly assigned to three treatments as well as the control treatment which included plantlets developing from the tomato seeds planted on the sterile filter paper and moisturized with sterile distilled water.

RAPD-PCR analysis using 5 universal primers were performed on DNA extraction from the fresh healthy leaves of the mother plants and from samples randomly taken plantlets derived from tissue culture for both tomato hybrids. Results have been obtained by using the primer OPC-O_3 which elect out of five primers confirmed the resemblance among the tissue culture seedlings which grown from synseeds (synthetic seeds) as well as with those grown from natural seeds, furthermore RAPD appears to be an efficient technique and a simple fast DNA marker for the early detection of genetic variation in plants produced by tissue culture technique.

المقدمة:

تعتمد تقانة RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) على إكثار قطع الدنا النباتية في تسلسلها النيوكليوتيدي عشوائيا حيث تضخم قطع الدنا الحاوية على تتابعات نيوكليوتيدية بحيث يمكن رؤيتها على شكل حزم مختلفة الوزن الجزيئي على هلام الآكاروز(16).إن أساس عمل هذا المؤشر يعتمد على استعمال بادئات قصيرة مصنعة من 10 نيوكليوتيدات وأحياناً تتكون من 17-30 نيوكليوتيدة (1). لهذه البادئات القدرة على الارتباط بمواقع عدة على جانبي شريط الدنا وتضاعفها وبذلك يتم الحصول على قطع عدة متضاعفة يمكن فصلها على هلام الآكاروز بعد تصبيغها ببروميد الأثيديوم والكشف عنها بالأشعة فوق البنفسجية.أشار (2) الى أن كفاءة البادئ المستخدم في تفاعلات RAPD تزداد بزيادة نسبة الكوانين + السايتوسين (G +C) فيه آخذين بنظر الاعتبار أن عدد الأواصر التي تربط G مع C هي ثلاثة أواصرهدروجينية في حين إن آصرتين تربطان بين A وT، وبذلك فإن الارتباط يكون أقوى بين البادئ وموقعة المكمل له على قالب الدنا في العينة المدروسة.

في مجال تحديد الثبات الوراثي لنباتات الطماطة *Lycopersicun Esculentum* Mill.الناتجة من زراعة الأنسجة، استخدمت مؤشرات الـ RAPD في الكشف عن التغايرات الوراثية التي قد تحصل عند الزراعة خارج الجسم الحي من خلال مقارنة تحليل نتائج البصمة الوراثية للنباتات النسيجية مع النباتات المنماة في الحقل لنفس الصنف، إذ قام كل من(3و 4) بتوظيف مؤشرات الـ RAPD للتحقق من مدى مطابقة نباتات الطماطة المنتجة من طريقة تكون الأعضاء غير المباشر مع بادرات الطماطة النامية في الحقل، وأظهرت النتائج عدم وجود تغايرات وراثية، كذلك لاحظ (5) التجانس الوراثي لنباتات البطاطا الناتجة من تكوين الأجنة الجسمية غير المباشر خارج الجسم الحي مع نباتات نفس الصنف من البطاطا النامية في الحقل.

وفي مجال تحديد التطابق الوراثي لنخيل التمر، بين (6) أن التشابه الوراثي Genetic similarity بين النباتات الأم والنباتات الناتجة من تكوين الأجنة الجسمية غير المباشر، قد تراوح بين (83-94)% اعتمادا" على التراكيب الوراثية. وفي المجال نفسه، استثمر (7) مؤشرات الـ RAPD للتحقق من الثبات الوراثي لنباتات النخيل المنتجة من البراعم العرضية المتكونة على كالس صنفين من النخيل هما البرحي والمكتوم، وقد أظهرت نتائج البصمة الوراثية تطابقا" تاما" في نمط توزيع الحزم لسبعة عشر بادئا" من أصل عشرين بادئا" ولصنفي الدراسة، واستنتجوا أن مؤشرات الـ RAPD هي من مؤشرات الدنا السهلة والسريعة في الكشف المبكر عن التغايرات الوراثية التي قد تحدث في نباتات نخيل التمر الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية.

واستخدمت هذه المؤشرات للكشف عن التغايرات الوراثية في النباتات الطبية المنتجة خارج الجسم الحي، إذ قام (8) بدراسة التجانس الوراثي لنباتات الـ *Cineraria maritima*النامية من البذور الصناعية مع نباتات الصنف نفسه النامية في الحقل ولاحظوا تطابق هذه النباتات وراثيا" وبنسبة زادت عن 94%، وكذلك أكد (9) على التطابق الوراثي لنباتات الـ *Ochreinauclea missionis*المكثرة نسيجيا" بطريقة تحفيز نمو البراعم الجانبية خارج الجسم الحي مع النباتات الأم المنماة بالطرق التقليدية.

المواد وطرائق العمل:

نفذت هذه الدراسة في مختبر قسم التقانات الإحيائية التابع لكلية العلوم الطبيعية/ جامعة بوزنان، بولندا. للفترة من تشرين اول2009/ لغاية نيسان/2010.

اختيار العينات النباتية:

اختيرت النباتات النسيجية النامية من البذور الصناعية التي تضم الأجنة الجسمية وبشكل عشوائي لكل من المعاملات المدرجة أدناه في جدول (1) ولهجيني الطماطة: الشروق و GS-12 وذلك بعد اسبوعين من زراعتها على وسط MS الخالي من الهرمونات.

جدول (1)

رمز المعاملة	نوع المعاملة
1 (معاملة المقارنة)	نباتات نامية من بذور طبيعية مزروعة على ورق ترشيح معقم ومرطب بالماء المقطر المعقم.
2	نباتات نامية من بذور صناعية مخزنة مدة شهر في درجة 4م° (سبق وان جهزت حشوتها بالـــ SA (2%) و $CaCl_2$ (12 ملغم/لتر) و BA(0.05 ملغم/لتر) و IBA(0.05ملغم/لتر).
3	نباتات نامية من بذور صناعية مجهزة بالـ SA (2%)، $CaCl_2$ (12 ملغم/لتر)، BA(0.05 ملغم/لتر)، IBA (0.01 ملغم/لتر).
4	نباتات نامية من بذور صناعية مجهزة بالـ SA (2%)، $CaCl_2$ (12ملغم/لتر)، BA(1ملغم/لتر)، IBA(0.01ملغم/لتر).

استخلاص الدنا:

عزلت المادة الوراثية (DNA) من الأوراق الفتية الخضراء للمعاملات المذكورة أعلاه وفقاً لطريقة (10) وكما يلي:

1. أخذ 1غم من الأوراق الفتية الخضراء وسحقت بسرعة في هاون خزفي مبرد مسبقاً بإضافة النتروجين السائل بكمية مناسبة وأستمر السحق بإضافة كميات أخرى حتى أصبحت الأوراق على شكل مسحوق أبيض ناعم.
2. نقل المسحوق إلى أنابيب بلاستيكية سعة 20سم^3 وأضيف إليه 3سم^3 من محلول الاستخلاص ومزجت بصورة جيدة مع المحلول وحضنت العينة على درجة حرارة 60ْم لمدة 60 دقيقة.
3. رفعت الأنابيب البلاستيكية وبردت إلى درجة حرارة 37ْم وأضيف لكل أنبوب 5سم^3 من محلول الكلوروفوم/آيزوأميل مع تحريك الأنبوبة لمدة 15 دقيقة.

4. وضعت الأنابيب البلاستيكية التي تحوي المزيج بجهاز النبذ المركزي وبسرعة 10000دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 40 ْم.

5. عزلت الطبقة العليا بعد نهاية عملية النبذ المركزي ونقلت إلى أنابيب بلاستيكية جديدة. أضيف 5سم^3 من الآيزوبروبانول المبرد لكل عينة لترسيب الدنا والذي ظهر على شكل خيوط بيضاء وترك لليوم التالي لإتمام عملية الترسيب.

6. نبذ المزيج بجهاز النبذ المركزي سرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة.

7. تم التخلص من الجزء الرائق (الكحول المذاب بالماء) وغسل الدنا بالكحول الأثيلي تركيز 99%. جففت الأنابيب في فرن على درجة حرارة 50 ْم ولمدة 15 دقيقة للتخلص من الكحول المتبقي. أضيف 0.05سم^3 من محلول الـ TE buffer لإذابة الدنا الملتصق بجدران الأنابيب.

8. تم التخلص من RNA المترسب مع الدنا بإضافة 4 مايكروليتر من إنزيمRNase على درجة حرارة 37مْ ولمدة 30 دقيقة، ثم رفعت العينات من الحرارة وأضيف لها 90 مايكروليتر صوديوم أسيتيت لترسيب وتنظيف الدنا، بعدها أضيف2سم^3 من كحول الإيثانول (99%) البارد جداً لتجميع الدنا ووضع في جهاز الطرد المركزي (10000دورة/دقيقة) لمدة 30 دقيقة. أعيدت عملية الغسل بالأيثانول (75%) وجففت العينات في Vacuum oven ثم أضيف لها 100-150 مايكروليتر من الماء المقطر.

9. نقلت عينات الدنا الذائب إلى أنابيب بلاستيكية Eppendorf tubes ذات غطاء محكم سعة 1.5سم^3 وحفظت العينات على شكل نموذج للدنا الأساس(Stock Sample)على درجة حرارة 20ـــــ م° لحين الاستعمال.

10. حضر هلام الآكاروز (0.7%) للكشف عن عينات الدنا المعزول، وبعد تصلبه وزعت العينات على الحفر واغلق جهاز الترحيل وبعد ثلاث ساعات من بدء الترحيل فحص الهلام باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية UV-spectrophotometer عند طول موجي 260 نانوميتر لرؤية حزم الدنا.

تحضير تفاعلات RAPD:

حضرت هذه التفاعلات استنادا" الى (11). اختبرت خمسة بادئات هي-OPA-05, OPA-08, OPB-06, OPB-08, OPC 03 لمعرفة أي منها تعكس تعددا" شكليا". قدرت الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالاعتماد على مواقع الحزم ذات الأحجام الجزيئية المعروفة والناتجة من قطع دنا الدليل الحجمي القياسي. رسم المنحني القياسي بين قيم الإحجام الجزيئية للدليل الحجمي الممثلة على المحور الصادي وقيم المسافات التي تبعد هذه الحزم عن حفر تحميلها داخل الهلام الممثلة على المحور السيني. قيست المسافة التي قطعتها كل حزمة (القطعة المضاعفة) من حزم العينات المدروسة. وبإسقاط عمود من تلك المسافة على المنحني القياسي، ومن نقطة التقاطع هذه، أسقط عمود آخر على المحور الصادي ليمثل حجم القطعة المضاعفة(12).

النتائج والمناقشة:

استخلاص الدنا:

عزل الدنا الكلي واستخلص من الأوراق الفتية النامية من معاملات هجيني الطماطة المدروسين، والتي اشتملت على المعاملات المذكورة في أعلاه، باستخدام مادة الـ CTAB في محلول الاستخلاص، بموجب طريقة **(10)**،ومن خلالها حصلنا على كمية كافية من الدنا لإجراء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز، ويلاحظ إن كل مادة من المواد التي استخدمت في عزل الدنا واستخلاصه تعمل على إزاحة إحدى مكونات الخلية غير المرغوب فيها وبنفس الوقت لا تسبب ضرراً له.تتميز جدر خلايا النباتات بسمكها لذا فان تحطيم الخلايا يتم باستخدام السحق اليدوي بوجود النتروجين السائل إذ تعمل درجات الحرارة المنخفضة على إيقاف نشاط الأنزيمات النووية والتي تتحرر مباشرة بعد تحطم الجدار الخلوي(13).

إنّ وجود مادة الـ CTAB في محلول الاستخلاص يعمل على تكوين معقد مع الحوامض النووية Nucleic Acids CTAB Complex تمنحها مقاومة التحلل وبالتالي تحافظ على هيكلها الأساسي مما يسهل فصلها عن البروتينات، إما أهمية مادة الـ EDTA والتي تعدّ عاملاً مخلبياً (Chelating agent)فإنها تعمل على مسك الأيونات الموجبة مثل Mg^{+2} الضرورية لفعالية الإنزيمات النووية التي تعمل على تحلل الأحماض النووية وبالتالي تثبيط عمل تلك الأنزيمات (14).

يؤدي الكلوروفورم دوراً مهماً في التخلص من الـ CTAB ومسخ البروتينات في المرحلة التالية من عملية الاستخلاص فضلا" عن تخلصه من السكريات المتعددة والمواد الأخرى في الخلية مثل الكلوروفيل بمساعدة النبذ المركزي، في حين يمنع كحول الآيزوأميل تكوَن الرغوة أثناء عملية الاستخلاص من خلال تقليله لعملية الشد السطحي للمواد الداخلة في عملية الاستخلاص. ويؤدي ملح كلوريد الصوديوم دوراً هاماً في المحافظة على الدنا من خلال توفير الازموزية المناسبة له، وبذلك يبقى الدنا بالطور المائي ويرسب بواسطة كحول الآيزوبروبانول المبرد، نقي بعدها الدنا المترسب من بقايا الماء والمواد الأخرى بغسله بالأيثانول 70%.

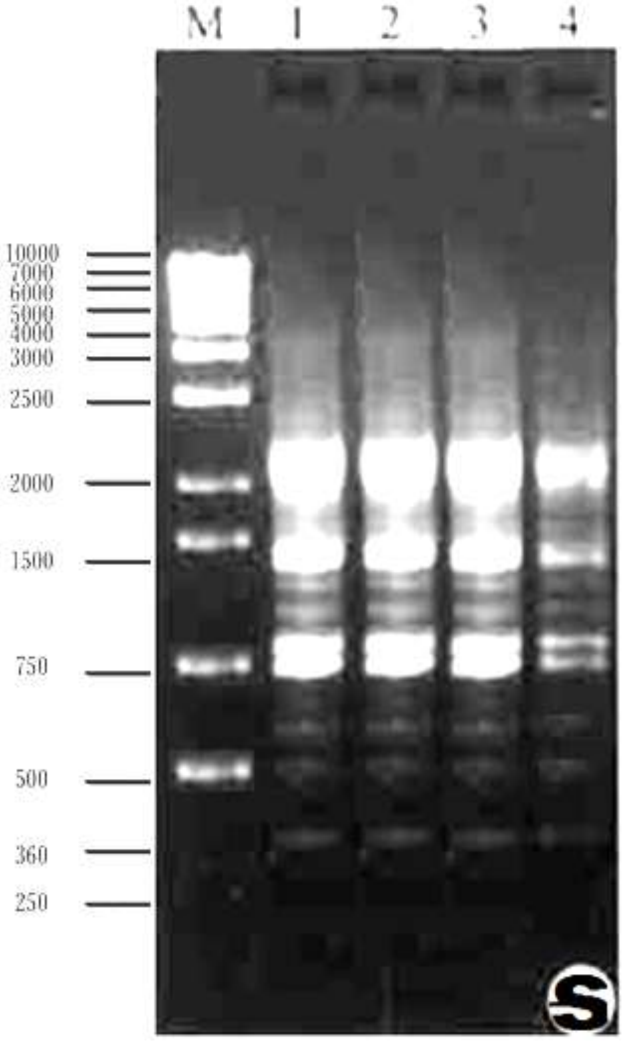
إما مادة mercaptoethanol فإنها تعمل على تحليل إنزيم DNase ومنع أكسدة المواد الفينولية وظهور اللون البني في المستخلص(15).

تفاعلات RAPD :

بينت النتائج أن البادئات الأربعة (OPA-05, OPA-08, OPB-06, OPB-08) لم تعط أي تضاعف على هلام الآكاروز، في حين أعطى البادئ OPC-03 تضاعفا" جيدا" ولعينات كلا هجيني الطماطة قيد الدراسة، علما" أن اختبار هذا البادئ كررت تجربته لثلاث مرات للتأكد من صحة نتائجه.

يبين الجدولين2 و3 والشكلين 1 و2عدد الحزم الناتجة والمسافة التي قطعتها وأحجامها الجزيئية المقدرة لعينات الدنا لمعاملات هجيني الشروق و GS-12 باستخدام البادئ OPC-03، ويلاحظ اعتماد ثلاث نقاط عند تحليل ومقارنة النتائج للعينات المدروسة، وهي:

1. ظهور الحزم: تشير نتائج الجدول 2والشكل 1الى إن عينات الدنا للمعاملات 2، 3، 4 فضلا" عن معاملة المقارنة (1) لهجين الشروق، أعطت 10 حزم لكل منها.
2. المسافة المقطوعة: لوحظ اختلاف المسافة المقطوعة لكل حزمة ضمن المعاملة الواحدة من نقطة بداية الترحيل، إذ قطعت الحزمة الأولى للمعاملات 2، 3 ومعاملة المقارنة، 60ملم، في حين قطعت الحزمة الأولى للمعاملة 4، 56 ملم، ويلاحظ تساوي المسافات المقطوعة للحزم التسع المتبقية للمعاملات الأربعة والتي بلغت 98ملم.
3. الوزن الجزيئي للحزم: اختلفت الأحجام الجزيئية المقدرة للحزم المتضاعفة ضمن المعاملة الواحدة، إذ بلغ أكبر حجم جزيئي للمعاملات1،2 و3، 1825زوج قاعدي (bp)،بينما بلغ 1900 زوج قاعدي للمعاملة4. وتساوت الحزم الأخرى لمعاملات هجين الشروق الأربعة في مقدار حجمها الجزيئي.



الشكل1: النواتج المتضاعفة من الدنا الكلي لمعاملات هجين الشروق المختلفة المتمثلة بـــ :

M: الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder.

1 : معاملة المقارنة (عينات من نباتات نامية من بذور طبيعية مزروعة على ورق ترشيح معقم ومرطب بالماء المقطر المعقم).

2 : نباتات نامية من بذور صناعية مخزنة مدة شهر في درجة 4م° (سبق وان جهزت حشوتها بالـــ SA (2%) و $CaCl_2$ (12 ملغم/لتر) و BA(0.05 ملغم/لتر) و IBA(0.05ملغم/لتر).

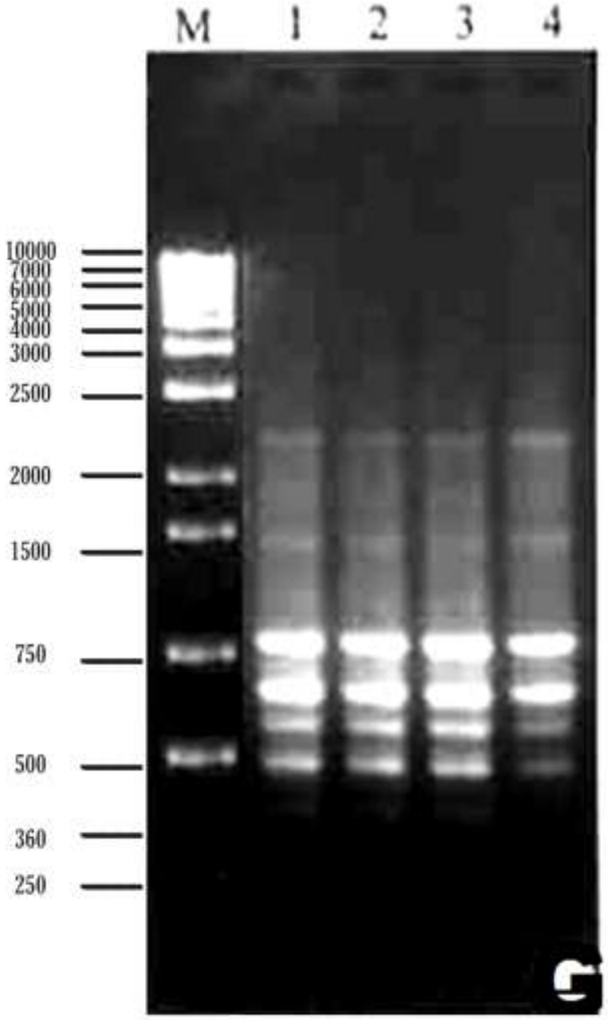
3: نباتات نامية من بذور صناعية مجهزة بالـ SA (2%)، $CaCl_2$ (12 ملغم/لتر)، BA(0.05 ملغم/لتر)، IBA (0.01 ملغم/لتر).

4: نباتات نامية من بذور صناعية مجهزة بالـ SA (2%)، $CaCl_2$ (12ملغم/لتر)، BA(1ملغم/لتر)، IBA(0.01ملغم/لتر).

جدول 2: عدد الحزم الناتجة والمسافة التي قطعتها(ملم) وإحجامها الجزيئية المقدرة لعينات الدنا لمعاملات هجين الشروق باستخدام البادئ OPC-03.

المعاملة	عدد الحزم	المسافة المقطوعة (ملم)	الحجم الجزيئي (bp)
(معاملة المقارنة) 1	10	60	1825
		65	1500
		68	1400
		70	1300
		74	1100
		78	850
		81	700
		90	565
		94	500
		98	360
2	10	60	1825
		65	1500
		68	1400
		70	1300
		74	1100
		78	850
		81	700
		90	565
		94	500
		98	360
3	10	60	1825
		65	1500
		68	1400
		70	1300
		74	1100
		78	850
		81	700
		90	565
		94	500
		98	360
4	10	56	1900
		65	1500
		68	1400
		70	1300
		74	1100
		78	850
		81	700
		90	565
		94	500
		98	360

أما بالنسبة للهجين GS-12، فيبين الشكل 2 والجدول 3 واعتمادا" على النقاط الثلاث السابقة، تشابه عدد الحزم الظاهرة للمعاملات الأربع المستخدمة والتي بلغت ست حزم لكل منها. قطعت الحزم للمعاملات كافة، مسافات متشابهة بدءا" من نقطة الترحيل على هلام الآكاروز، والتي بلغت 97 ملم. ويلاحظ إن اختلاف الأوزان الجزيئية للحزم تبعا" للمسافة المقطوعة ضمن المعاملة الواحدة، قد تشابه للمعاملات الأربع لهجين الـ GS-12.



الشكل2: النواتج المتضاعفة من الدنا الكلي لمعاملات هجين GS-12 المختلفة المتمثلة بـــــ :

M: الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder.

1: معاملة المقارنة (عينات من نباتات نامية من بذور طبيعية مزروعة على ورق ترشيح معقم ومرطب بالماء المقطر المعقم).

2 : نباتات نامية من بذور صناعية مخزنة مدة شهر في درجة 4م° (سبق وان جهزت حشوتها بالـــــ SA (2%) و $CaCl_2$ (12 ملغم/لتر) و BA(0.05 ملغم/لتر) و IBA(0.05ملغم/لتر).

3: نباتات نامية من بذور صناعية مجهزة بالـ SA (2%)، $CaCl_2$ (12 ملغم/لتر)، BA(0.05 ملغم/لتر)، IBA (0.01 ملغم/لتر).

4: نباتات نامية من بذور صناعية مجهزة بالـ SA (2%)، $CaCl_2$ (12ملغم/لتر)، BA(1ملغم/لتر)، IBA(0.01ملغم/لتر).

جدول 3: عدد الحزم الناتجة والمسافة التي قطعتها(ملم) وإحجامها الجزيئية المقدرة لعينات الدنا المتضاعفة لمعاملات هجين GS-12باستخدام البادئ OPC-03.

المعاملة	عدد الحزم	المسافة المقطوعة (ملم)	الحجم الجزيئي (bp)
(معاملة المقارنة) 1	6	53	2100
		66	1500
		81	750
		87	675
		92	590
		97	500
2	6	53	2100
		66	1500
		81	750
		87	675
		92	590
		97	500
3	6	53	2100
		66	1500
		81	750
		87	675
		92	590
		97	500
4	6	53	2100
		66	1500
		81	750
		87	675
		92	590
		97	500

إن اعتماد تحليل نتائج دراسة العلاقة الوراثية على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم النباتات المدروسة وعلى الأوزان الجزيئية لتلك الحزم، تتفق مع كل من(18,17,16). ولم تؤخذ بالاعتبار الاختلافات في شدة تألق الحزم للأسباب الآتية:

1. ظهور بعض الحزم التي لها نفس الوزن الجزيئي بشكل حزمة سميكة واحدة، وهي في الحقيقة عدد من الحزم المتجمعة معا".
2. يؤدي زيادة تركيز دنا القالب الى تكرار عدد نسخ دنا الهدف ومن ثم يتضاعف نفس الموقع أكثر من مرة.
3. صعوبة تحديد التركيز الدقيق للدنا، لتأثره بعدة عوامل(19).

يتبين من نتائج الجدولين 2 و 3 إن المعاملات المختلفة المستخدمة في إنتاج البذور الصناعية لهجيني الطماطة، والمتمثلة بمنظمات النمو النباتية ومواد تغليف الأجنة الجسمية فضلا" عن أملاح وسط MS المستخدمة، لم تؤثر في التركيب الوراثي للنباتات النامية من هذه البذور مقارنة مع النباتات النامية من البذور الطبيعية لكلا الهجينين، إذ أظهرت المعاملات 2 و 3 و4 تطابقا" تاما" مع معاملة المقارنة (1) ولكلا هجيني الطماطة، في عدد الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم النباتات المستخدمة فضلا" عن الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسل البادئ OPC-03على شريط دنا القالب، في حين لم تُعط البادئات الأخرى أي نتيجة تضاعف بالرغم من إعادتها أكثر من مرة، وذلك بسبب غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات في جينوم نباتات هجيني الشروق و GS-12 (20,19,18).

تتفق هذه النتائج مع كل من (3 و10) الذين وظفوا مؤشرات الـ RAPD للتحقق من مدى مطابقة نباتات الطماطة المنتجة من طريقة تكون الأعضاء غير المباشر خارج الجسم الحي مع بادرات الطماطة النامية في الحقل، وأظهرت النتائج عدم وجود تغايرات وراثية.

المصادر:

1. Cactaqnone-Sereno, P.; F. Vanlerberghe-Masutti and F. Leroy. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. Genome., 37: 904-909.
2. Fristch, P.; M.A. Hanson.; C.D. Spore.; P.E. Pack, and L.H. Riseberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxo of flowering plants. Plant. Mol. Biol. Rep.,11:10-20.
3. Soniya, E. V.; N. S. Banerjee and M. R. Das. 2001. Genetic analysis of somaclonal variation among callus derived plants of tomato. CURRENT SCIENCE, 80(9):1213-1215.
4. Mansour, A.; M. Zaki; A. H. Fayed and A. shawky. 2005. Biochemical and molecular markers associated with callus induction in some tomato cultivars. Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.),1:21-28.
5. Vargas, T. E.; N. Vidal; M. Oropeza and E. Garcia. 2008. Genetic stability of *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree plantlets obtained from embryogenic cell suspension cultures. INIEREIENEIA, 33(3):213-217.
6. Eshraghi, P.; R. Zarghami and H. Ofoghi. 2005. Genetic stability of micro propagated plantlets in date palm. J. of Sc., I. R. I., 16(4):311-315.
7. Bader, S. M.; M. Baum; H. S. M. Khierallah and W. Chouman. 2007. The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of date palm plantlets derived from *in vitro* culture of inflorescence. J. Edu. & Sci., the first conference on biology, pp. 149-159.
8. Srivastava, V.; S.A. Khan and S. Banerjee. 2009. An evaluation of genetic fidelity of encapsulated micro shoots of two medicinal plants: *Cineraria maritima* following six months of storage. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 99:193-198.
9. Chandrika, M. and V. Ravishankar. 2009. Polyzygus tuberosus Diaz. An assessment of genetic stability in micro propagated plants of *Ochreinauclea missoionis* by RAPD markers. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 3(3):10-21.

10. Dellaprota, S.L.; J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA mini-preparation. Version II.Plant. Mol. Biol. Rep., 1:19-21**.**

11. Williams, S.J.G.K.; H.R. Kubelik.; K.J. Livak.; J.A. Rafalski and S.V. Tinegy. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18:6531-6535**.**

12. Sambrook, J.; E.F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor**.**

13. Pandey, R.N.; R.P. Adams, and L.E. Flournoy. 1996. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) by plant polysaccharides. Plant Mol. Biol. Rep., 14: 17-22**.**

14. Maniatis, T.; E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory. New York**.**

15. Weising, K. and G. Kahl. 1997. Hybridization-based Micro satellite fingerprinting of plant and fungi. In: Caetano-Anolles, and P.M. Gresshoff: DNA Markers: Protocols, Applications and Overview (eds), Wiley-VCH, New York. USA**.**

16. Swoboda, I. and P. L. Bhalla .1997. RAPD analysis of genetic variation in the Australian sun flower Scaevola. Genome, 40: 600 – 606.

17. Barone, A., A. Sebastiano and D. Carputo. 1999. Chromosome pairing in *Solanum commersonii, S. tuberosum* sexual hybrids detected by commersonii–specific RAPDs and cytological analysis. Genome , 42: 218–224**.**

18. الشمري، إبراهيم عبدالله حمزة.2007. تحفيز وتقويم التغاير الوراثي لتحمل الجفاف في بعض أصناف الحنطة *(Triticum aestivum* L.) خارج الجسم الحي**.**أطروحة دكتوراه. جامعة بغداد، كلية الزراعة، بغداد، العراق.ع.ص 129-146**.**

19. حسين، جنان قاسم.2007. تأثير الصعق الكهربائي في تغايرات النمو الخضري والزهري وDNA بعض نباتات الزينة. أطروحة دكتوراه. جامعة بغداد، كلية الزراعة، بغداد، العراق. ص93**.**

20. خير الله، حسام سعد الدين محمد.2007. الإكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. باستخدام النورة الزهرية ودراسة الثبات الوراثي باستخدام مؤشرات تباين أطوال قطع الدنا المتضاعفة (AFLP). أطروحة دكتوراه. جامعة بغداد، كلية الزراعة، بغداد، العراق.ع.ص107-253**.**