

تقييم تأثير استخدام بعض الاسمدة الكيميائية على بعض الصفات الفسلجية والوراثية وبعض المواد الفعالة لنبات الكرفس (*Apium graveolens* L.)

إبراهيم عمر سعيد

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

E. mail: Dr.ibrahim1977@yahoo.com

الملخص

أجريت تجربة السنديين سعة (5 كغم) في الموسم الزراعي 2013 على نبات الكرفس المحلي *Apium graveolens* L. لتحديد كفاءة استخدام مستويات مختلفة من اسمدة النتروجين والفسفور وتداخلتهما على الصفات الفسلجية والوراثية والمواد الفعالة لنبات الكرفس، واستخدم تصميم التجربة العاملية Factorial Experiment باستعمال ثلاثة مستويات من النتروجين على هيئة سماد اليوريا $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (46%N) وثلاثة مستويات من الفسفور على هيئة سماد سوپر فوسفات الكالسيوم الثلاثي $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (45%P₂O₄) وثلاثة مستويات من النتروجين والفسفور على هيئة سماد مختلط، ووضحت نتائج الدراسة ما يلي:.

تأثير سماد النتروجين عند المعاملة N₁ في زيادة معنوية لتراكيز البوتاسيوم والصوديوم والمغنسيوم والمحتوى ونسبة الزيت والمواد الفعالة للنبات وكانت (2.140,1.570,23.413,0.428,0.281,1.476,21.353) على التوالي . كما لوحظ انخفاض معنوي في صفات الكلوروفيل A و الكلوروفيل B والكلوروفيل الكلي عند المعاملة بتراكيز مختلفة من الأسمدة. كما أظهرت نتائج تقنية ال RAPD احدى عشر بادئ اختلافا واضحا في عدد حزم ال DNA المتضاعفة وتباينا واضحا في أوزانها الجزيئية .

الكلمات الدالة: نبات الكرفس ، صفات فسلجية ، معالم وراثية، مواد فعالة.

المقدمة

يعد نبات الكرفس *Apium graveolens* L. ثاني أهم محاصيل الخضار التابعة للعائلة الخيمية Umbelliferae حيث يعد الكرفس نبات ثنائي الحول Biennial، وأوراقه مركبة ذات سويقات طويلة تصل الى 40 سم في الطول وأزهاره بيضاء مخضرة صغيرة محمولة على نوربات مظلية مركبة Compound umbles تحوي من (6-12) شعاع نجمية الشكل ولها اعناق قصيرة ، البتلات عادة صغيرة (0.5) ملم ولونها ابيض او اخضر او اصفر اما البذور فتكون صغيرة جدا مسطحة Flat عرضها اكبر من طولها والثمار بنية اللون لها رائحة عطرية نفاذة وطعم حار (1). يفضل نبات الكرفس البيئات الرطبة الباردة، وينمو في جميع انواع التربة عدا الطينية ولكن ينمو بشكل افضل في التربة الرملية Sandy soil ويوجد الاسمدة العضوية (2)، يحتوي الكرفس على زيوت طيارة Volatile oils منها 60-70% Limonene و 10-15% β.Selinene ومركبات Phthalide ومنها 3-butylidenphthalide (3). ويحتوي على مجموعة فلافونويدات منها apigenin و Isoquercitrin و Bgraveobioside وكلايكوسايد يعرف بالابين apin و فيوروكيومارينات furocumarins مثل bergapten و (4) umbelliferone، ويحتوي ايضا على أحماض دهنية عدة كذلك يحتوي على أحماض أمينية ومواد مخاطية (5) ودهون ونشأ وكولين Choline (6). حيث يعد النتروجين من العناصر التي يحتاجها النبات في مراحل نموه المختلفة فهو يدخل في بناء البروتوبلازم والبروتينات والانزيمات ومرافقاتها مثل NADPH₂ ، NADH₂ ومركبات الطاقة (ATP/CTP و GTP) وفي تكوين الاحماض الامينية التي يعد

الحجر الاساس في تكوين البروتينات (7,8,9) كما يعتبرالفسفور من العناصر الرئيسية في تغذية النبات فهو يدخل في عمليات نمو وتشكل وانقسام الخلايا النباتية وتكوين البذور. يأتي الفسفور في المرتبة الثالثة من حيث الكمية التي يحتاجها النبات بعد النتروجين والبوتاسيوم ولمعظم المحاصيل الزراعية ، ان تعرض الكائن الحي للعوامل الفيزيائية والكيميائية يحدث تغيرات في تسلسل ال DNA الحامض النووي المنقوص الاوكسجين وللكشف عن تلك التغيرات ازادت في السنوات الاخيرة استخدام المؤشرات الجزيئية في الكشف عن العوامل المطفرة التي تؤثر على تسلسل ال DNA (10) ومن بين تلك المؤشرات الرخيصة والسهلة الاستخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة Random Amplified DNA (RAPD) Polymorphic DNA التي تتسم ببساطتها وسرعتها وعدم تطلبها لكمية كبيرة من ال DNA وإمكانية تطبيقها على مجتمعات وراثية كبيرة الحجم، إضافة إلى توفر عدد كبير جدا من البادئات العشوائية المعروفة التسلسل النيوكليوتيدي المستخدمة في هذه التقنية يسمح بتغطية مناطق مختلفة من جينومات الكائنات المدروسة كما لا يتطلب انجازها وقتا طويلا وانها غير معقدة ولا تحتاج الى وجود مواد مشعة (11,12). كما انها تعتبر طريقة جيدة للكشف عن مدى واسع من الضرر الذي يصيب ال DNA من خلال التغيرات التي تحصل في كثافة الحزموه وفقدان او ظهور حزم جديدة على هلام الاكاروز عند مقارنة نتائج تقنية ال RAPD للعينات المعاملة والغير معاملة بعد التعرض للمؤثرات والتي يمكن ان تكون كدليل على حدوث تلك التغيرات في تسلسل ال DNA (13,14). لذلك هدفت هذه

- البوتاسيوم فقدر باستعمال جهاز Flam Photometer وحسب الطريقة التي أوردتها (20)

- عزل ال DNA:

تم عزل ال DNA من اوراق نبات الكرفس للعينات المعاملة وغير المعاملة باستخدام طريقة ال CTAB (21) وتم اختبار نوعيته باستخدام الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1% وقيس تركيزه في العينات باستخدام جهاز (Nanodrop, Germany) وحسبت نقاوته والتي تراوحت بين 1.61-1.82، تم توحيد تركيز عينات الدنا إلى 25 نانوجرام/ميكرو لتر باستخدام الماء المقطر المعقم.

- تفاعلات ال RAPD-PCR

أجريت تفاعلات التضخيم العشوائي لقطع الحمض النووي الدنا (RAPD-PCR) وفقاً لما ذكره (22) باستخدام العدة (AccuPower PCR premix Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية وحسب التعليمات المرفقة. تحتوي كل أنبوبة على المكونات الأساسية لتفاعل البلمرة المتسلسل والتي تشمل وحدة واحدة من أنزيم Taq DNA polymerase، 250 μM من مزيج القواعد النتروجينية dNTPs، 10 mM Tris-Hcl (pH 9)، 30 mM KCL و 1.5 mM MgCl2، 10 picomole من كل بادئ والمجهزة من شركة (OperonTech.Inc.,USA) المبينة في الجدول رقم (2) و 25 نانوجرام من ال DNA ثم أكمل حجم التفاعل بالماء المقطر المعقم إلى 20 μL لكل أنبوبة.

الجدول (2): بوضوح الاسم والتسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في

تقنية ال RAPD :

ت	اسم البادئ	التسلسل النكليوتيدي
1	OPE-20	AACGGTGACC
2	OPH-14	ACCAGGTTGG
3	OPA-11	CAATCGCCGT
4	OPQ-20	TCGCCAGTC
5	OPN-16	AAGCGACCTG

مزجت الأنابيب بشكل جيد ونقلت إلى جهاز المدور الحراري (Thermocycler) لإنجاز التفاعل التضاعفي بعد أن تمت برمجته حسب البرنامج: دورة واحدة لمدة دقيقتان على درجة حرارة 94م° للمسخ الأولي لشريط الدنا تليها 40 دورة تضاعف تتضمن كل دورة دقيقة واحدة على درجة 92م° لمسح قالب ودقيقة واحدة على درجة 36م° لربط البادئات بالدنا قالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة 72م° للاستطالة مع دورة أخيرة لمدة 7 دقائق وعلى درجة 72م° للاستطالة النهائية. رحلت نواتج عملية التضخيم على هلام الأكاروز بتركيز 1.2% مع الدليل الحجمي المتكون من دنا لإمداد المقطع بأنزيم ال Hind III وال Eco RI ولمدة 90 دقيقة بمقدار (5 فولت/سم)، فحص الهلام بعد تصبيغه بصبغة بروميد الأثيديوم لمدة 30-45 دقيقة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV-Light) وصور باستخدام Gel Documentation System (23).

تسجيل نتائج ال RAPD

الدراسة إلى تأثير مستويات مختلفة من الأسمدة على الصفات الفسلجة والمواد الفعالة والمادة الوراثية للنبات.

مواد وطرائق العمل

- تصميم التجربة والمعاملات المستخدمة

أجريت تجربة سنادين بلاستيكية على تربة مزيجية جففت ونخلت بمخل قطر فتحاته 2ملم، حيث قدرت بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية بالطرق الواردة (15) والمبينة في جدول (1). استخدم تصميم التجربة العاملية ((Factorial Design باستخدام اربع مستويات من سماد اليوريا (45%N) هي 0، 0.5، 1، 1.5، 0 غم N تمثل N1 و N2 و N3 وثلاث مستويات من سماد سوبر فوسفات الكالسيوم الثلاثي (21% P) هي 0.25، 0.50، 0.75 غم تمثل P1 و P2 و P3 وثلاث مستويات من السماد المختلط بين سمادي اليوريا وسوبر فوسفات من سماد كبريتات البوتاسيوم (N و P) هي 0.5 و 1.0 و 1.5 غم تمثل M1 و M2 و M3، تم إضافة هذه الاسمدة الى التربة قبل زراعة نبات الكرفس وبالتصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design وذلك بملئ السنادين الى قرب نهاياتها بالتربة المزيجية وزرعت بذور نبات الكرفس المحلي بتاريخ 2013/11/2، وحللت تربة التجربة كما مبين في الجدول (1)

جدول (1) الصفات الفيزيائية والكيميائية لتربة الحقل

العينة	التربة المزيجية
رمل % Sand	70.8
سلت - غرين % Silt	18.62
طين %	8.4
نسجة التربة	رملية مزيجية
E.c	1.1
1 : 1 pH	7.5
Organic Material mg/kg	1.2

*مختبر قسم التربة / كلية الزراعة / جامعة تكريت

- تحليل النبات وتقدير العناصر الغذائية:

تم اخذ العينات النباتية وبشكل عشوائي لكل وحدة تجريبية وفي نهاية مرحلة النمو إذ جمعت العينات النباتية ونظفت وغسلت جيدا ثم جففت هوائيا في جو الغرفة ووضعت في الفرن الكهربائي على درجة حرارة 65-70 م° ولمدة 48-72 ساعة ولحين ثبات الوزن (16) ثم طحنت بطاحونة يدويه واخذ من كل عينة وزن 0.4 غم ووضعت في قناني خاصة بالهضم إذ هضمت طريا Wet Digestion باستخدام خليط من حامضي الكبريتيك والبيروكلوريك المركزين ويُعد تغير لون المحلول إلى اللون الأبيض الرائق دلالة على تمام عملية الهضم ونقلت إلى قناني أخرى سعة 100 مل وأكمل الحجم للعلامة بالماء المقطر . وقد تم تقدير العناصر الغذائية كالآتي:

- تقدير تركيز النتروجين بوساطة جهاز مايكروكلدال Micro Kjeldahl وحسب الطريقة التي أوردتها (17) واعتمادا على (18)

- تقدير الفسفور بالطريقة اللونية وباستعمال جهاز Spectrophotometer وحسب الطريقة التي أوردتها (19)

Universal من شركة Schmelz و Haensch (21201) الماني المنشأ وبدرجة حرارة (20 م⁰).

- تقدير المركبات الفعالة (%):

تم تشخيص نوعية وكمية الزيوت الطيارة في العينات باستعمال جهاز HPLC المجهز من شركة Shimadzu نوع FLC-10A ، المزود بمقياس الطيف بالأطوال الموجية المتغيرة Spectrophotometer-Spd-6A-Uv وسرعة جريانه 1.2 ml/min ، وقد تم حقن العينة وسجلت البيانات بواسطة الحاسبة التي تقوم برسم الكروماتوغراف وتم استخدام المركبات القياسية لنبات الكرفس كما تم فصلها والتعرف على مساحة حزمة النموذج القياسي (Peak area) وزمن الاحتجاز (Retention time) وارتفاع الحزم، ثم تم قياس زمن احتجاز ومساحة وارتفاع الحزم الناتجة من حقن العينات بعد ذلك تمت مقارنة الحزم التي حصلنا عليها مع حزم المحلول القياسي الناتجة تحت الظروف نفسها وكررت العملية على كل نماذج العينات التي تم تشخيصها وتحت ظروف الفصل نفسها (25) وقد جرت القياسات في شركة الحقول البيضاء/بغداد/الوزيرية. تم حساب تركيز المركبات في النموذج وفق المعادلة الآتية وحسب طريقة (26) :

سجلت نتائج تقنية الRAPD عن طريق فحص صور أنماط الفصل الكهربائي لكل بادئ وتسجيل الحزم (Bands) لكل بادئ في جدول بحيث تعامل كصفة ثنائية يمثل وجود الحزمة (Band) ب (1) وغياب الحزمة (Band) ب (صفر) ومن هذا الجدول تم حساب العدد الكلي للحزم ال RAPD التي تظهرها كل بادئة في الترايب الوراثية من نبات الكرفس المدروس وتحديد الحزم الغائبة والجديدة عند المقارنة بين العينات المعاملة وغير المعاملة بالأسمدة الكيميائية

3-4- طريقة استخلاص الزيوت الطيارة Method of Extraction Volatile oils

- الاستخلاص بواسطة التقطير البخاري Steam distillation : تم استخلاص الزيت الطيار لنبات الكرفس بطريقة التقطير البخاري Steam distillation method والموصوفة في British pharmacopoeia لعام 1958

- معامل الانكسار Refractive index (درجة):

يمثل النسبة بين جيب زاوية سقوط الضوء الى جيب زاوية انكساره في درجة حرارة معينة (24) قدر معامل الانكسار لجميع عينات الزيت الطيار باستعمال جهاز Abbe Refractometer نوع Abb Type

مساحة حزمة المركب

$$\text{تركيز المركب في العينة} = \frac{\text{تركيز النموذج القياسي (المعلوم)} \times \text{معامل التخفيف}}{\text{مساحة حزمة النموذج القياسي}}$$

- التحليل الاحصائي

حللت البيانات احصائياً حسب تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (R. C. B. D) باستخدام برنامج SAS ثم فورنت المتوسطات حسب اختبار (دكن متعدد الحدود) وعلى مستوى احتمالية (5%) (27)

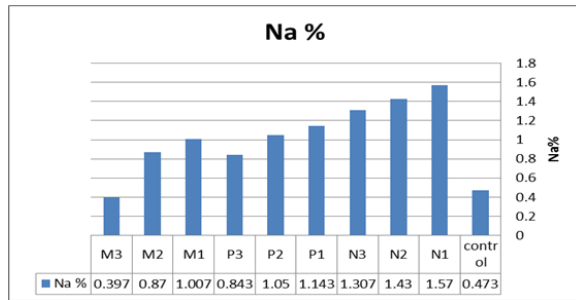
النتائج والمناقشة

تشير النتائج في الجدول (3) والاشكال من (1-7) الى تأثير التسميد النايتروجيني والفسفاتي في بعض الصفات الفسلجية ، وظهرت النتائج ان اضافة السماد النايتروجيني عند تركيز 0.5غم ادت الى زيادة معنوية في جميع الصفات المدروسة وتعزى هذه الزيادة الى عنصر النيتروجين والذي يعتبر من العناصر الاساسية في زيادة تكوين صبغات الكلوروفيل والكاروتينات في الاوراق وبذلك تزداد عملية التركيب الضوئي ونتيجة لذلك تزداد كمية المواد الغذائية المصنعة

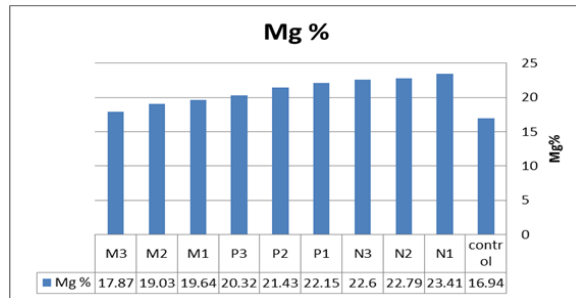
بالنبات، فضلا ان النتروجين يعد عنصرا أساسيا وضروريا لنمو النباتات ويدخل في العديد من العمليات الحيوية التي تؤدي الى تحفيز نمو النبات من خلال زيادة حجم وعدد الخلايا وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (28,29). ماعدا صفتي الوزن الرطب والجاف اذ سجلت معاملة السيطرة والتركيز الثالث من النتروجين اعلى القيم وكانت (1.333,1.590) علي التوالي ويعزى سبب انخفاض الوزن الرطب والجاف عند اضافة تراكيز مختلفة من الأسمدة الى ان لهذه العناصر اثار سلبية في عمليات الانقسام والتمايز الخلوي وتغيير انتظام انسجة النقل (30) اذ يلاحظ من الاشكال من (1-7) ان جميع الصفات المدروسة تقل تدريجيا بزيادة تراكيز الأسمدة. ويظهر من الاشكال من (1-6) ان امتصاص عنصر النيتروجين بالنبات اكثر من امتصاص باقي العناصر الاخرى بحيث انه يشكل 2% من البروتوبلازم الحى.

جدول (3) تأثير تراكيز الأسمدة على الصفات الفسلجية والوراثية والمود الفعالة لنبات الكرفس

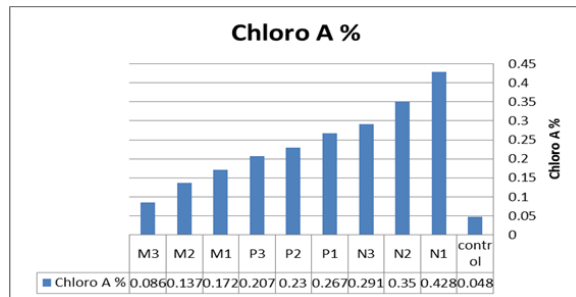
المعاملات	K %	Na %	Mg %	Ch. A Mg/g	Ch. B Mg/g	Ch. A+B Mg/g	Oil (%)	refractive index	Fresh weight Mg/g	dry weight Mg/g
control	i0.340	d0.473	i16.940	j0.048	f.013	e0.279	g12.517	h12.437	a1.590	ab1.063
N ₁	a2.140	a1.570	a23.413	a0.428	a0.281	a1.476	a21.353	a21.243	f1.443	ab1.267
N ₂	ab2.100	ab1.430	b22.790	b0.350	b0.174	a1.379	b20.063	b20.063	e1.463	c0.247
N ₃	b2.020	abc1.307	b22.600	c0.291	b0.179	b1.086	c16.787	c16.783	d1.483	a1.333
P ₁	c1.917	abc1.143	c22.150	d0.267	c0.141	bcd0.839	d14.773	d14.783	c1.517	bc0.647
P ₂	d1.767	bc1.050	d21.433	e0.230	c0.132	cd0.716	de14.313	de14.240	c1.537	ab1.173
P ₃	e1.630	cd0.843	e20.323	f0.207	d0.112	cde0.610	def13.980	def13.990	c1.537	abc0.723
M ₁	f1.413	bc1.007	f19.643	g0.172	d0.100	e0.442	d-g13.623	efg13.450	bc1.573	abc0.807
M ₂	g1.050	cd0.870	g19.027	h0.137	e0.036	e0.367	efg13.217	fgh13.217	b1.577	ab1.213
M ₃	h0.723	d0.397	h17.870	i0.086	ef0.025	bcd0.843	fg13.020	gh13.003	b1.583	ab0.933



شكل (2) تأثير إضافة تراكيز الاسمدة المختلفة على عنصر الصوديوم (غم) في نبات الكرفس.

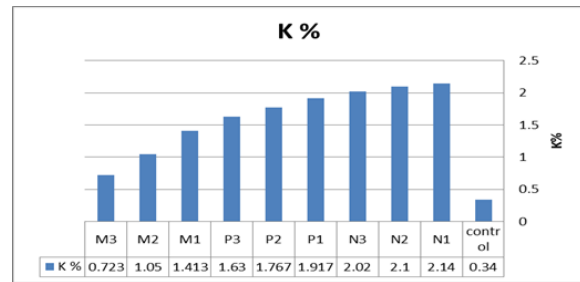


شكل (3) تأثير إضافة تراكيز الاسمدة المختلفة على عنصر المغنسيوم (غم) في نبات الكرفس.



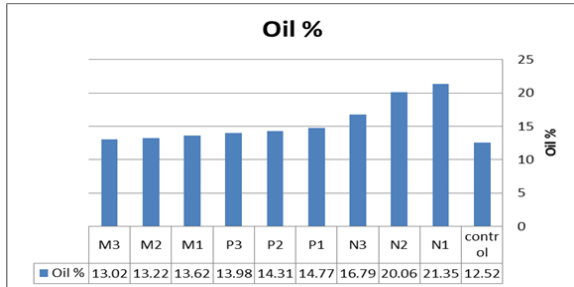
شكل (4) تأثير إضافة تراكيز الاسمدة المختلفة على كلوروفيل A (غم) في نبات الكرفس.

ويلاحظ من الأشكال (1,2,3) ان تراكيز البوتاسيوم والصوديوم والمغنسيوم يزداد في أوراق النبات عند المعاملة بسماد النتروجين والفسفور وخاصة عند المعاملة N₁ مقارنة مع معاملة المقارنة ويقف عند التداخل بينهما وهذا يتفق مع (31) عند دراسته على نبات الباقلاء *Vicia faba L.* وكذلك دراسة (32) إذ أشار ان تراكيز العناصر الغذائية تزداد بوراق نبات الكرفس المعاملة قياسا بالنباتات الغير المعاملة. اما الاشكال (4,5,6) يلاحظ ان قيم الكلوروفيل a والكلوروفيل b والكلوروفيل a+b تقل بزيادة تراكيز الأسمدة بصورة معنوية قياسا الى معاملة المقارنة وان سبب الانخفاض هذا يعود الى ان مستويات الكلوروفيل يمكن ان تعكس التغيرات الفسلجية التي تحدث في النبات عند تعرضها لهذه الأسمدة او ان تراكيز العناصر تثبط البناء الحيوي للكلوروفيل (33). توضح الأشكال (7, 8) بأن إضافة تراكيز الاسمدة قد أدت إلى ارتفاع وانخفاض بصورة معنوية في تراكيز الوزن الرطب مقارنة بعدم الاضافة كما نلاحظ بان قيم الوزن الرطب تزداد تدريجيا وبشكل معنوي عند زيادة تراكيز الأسمدة وهذا يتفق مع (32,34,35,36) عند دراستهم لنبات الكرفس.

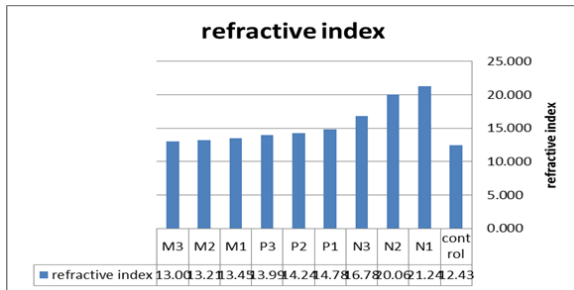


شكل (1) تأثير إضافة تراكيز الاسمدة المختلفة على عنصر البوتاسيوم (غم) في نبات الكرفس.

صفات الزيت الفيزيائية الى التأثير الإيجابي للأسمدة في الصفات الخضرية والمحتوى الكيميائي من العناصر الغذائية للنباتات المعامل وهذا ما وجدته (36) إذ لاحظ زيادة في نسبة الزيت لنبات الكرفس عن إضافة الحديد المخلي للنبات قياسا للنباتات الغير المعاملة.



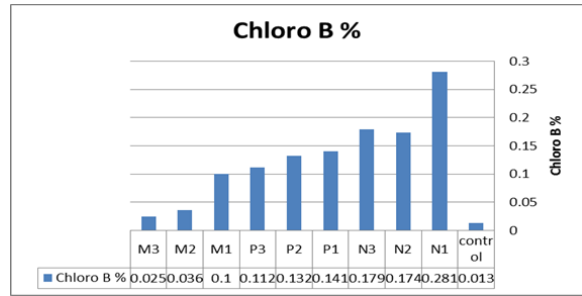
شكل (9) تأثير إضافة تراكيز الأسمدة المختلفة على نسبة الزيت (غم) في نبات الكرفس



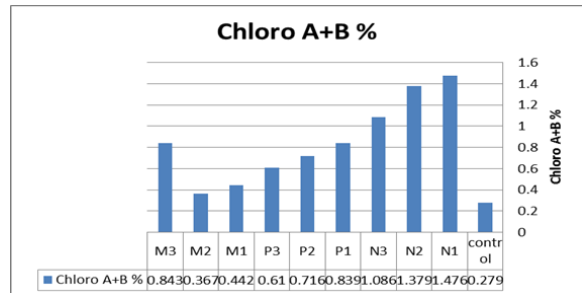
شكل (10) تأثير إضافة تراكيز الأسمدة المختلفة على معامل انكسار الزيت الطيار لنبات الكرفس

نتائج تقنية RAPD

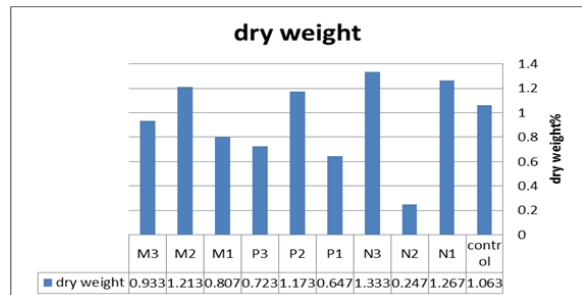
استخدمت تقنية ال RAPD لتقييم التأثيرات الوراثية للتراكيز المختلفة للأسمدة الكيميائية (سماد اليوريا، سوبر فوسفات الكالسيوم الثلاثي، كبريتات البوتاسيوم) على نبات الكرفس وذلك بالمقارنة مع النباتات الغير معاملة كمجموعة سيطرة، حيث أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لتقنية ال RAPD لخمس بادئات استخدمت في هذه الدراسة اختلافا واضحا في عدد حزم ال DNA المتضاعفة، وتباينا واضحا في اوزانها الجزيئية وذلك تبعا للبادئ المستخدم واعتمدت طريقة تقييم التأثيرات الوراثية على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم النباتات المستخدمة التي تعتمد على العدد والمواقع المكتملة لتسلسلات البادئات على شريط ال DNA القالب للنباتات المعاملة وغير المعاملة وذلك بالاعتماد على نوع البادئ المستخدم حيث يوضح الجدول رقم (4) والشكل (11,12) ملخص لنتائج تقنية ال RAPD للبادئات المستخدمة.



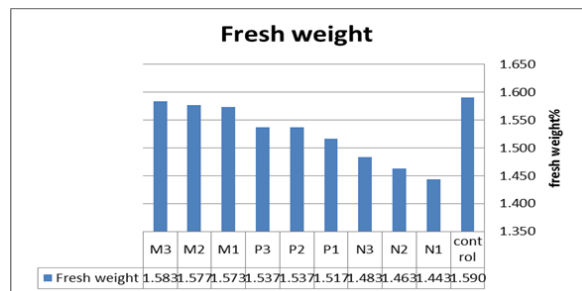
شكل (5) تأثير إضافة تراكيز الأسمدة المختلفة على كلوروفيل B (غم) في نبات الكرفس.



شكل (6) تأثير إضافة تراكيز الأسمدة المختلفة على كلوروفيل (A+B) الكرفس



شكل (7) تأثير إضافة تراكيز الأسمدة المختلفة على الوزن الجاف (غم) في نبات الكرفس



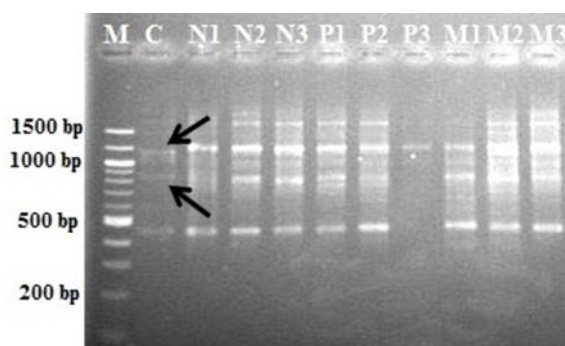
شكل (8) تأثير إضافة تراكيز الأسمدة المختلفة على الوزن الرطب (غم) في نبات الكرفس

والشكل (9) توضح وجود تأثير معنوي عند إضافة الأسمدة وخاصة عند المعاملة N₁ و N₂ في النسبة المئوية للزيت لنبات الكرفس مقارنة بالنباتات التي لم يضاف إليها الأسمدة ويمكن ان تعزى الزيادة في

جدول (4): يوضح بعض التغيرات في نتائج تقنية ال RAPD ل DNA نبات الكرفس بعد المعاملة بتركيز مختلفة من ثلاث انواع من الاسمدة الكيميائية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة

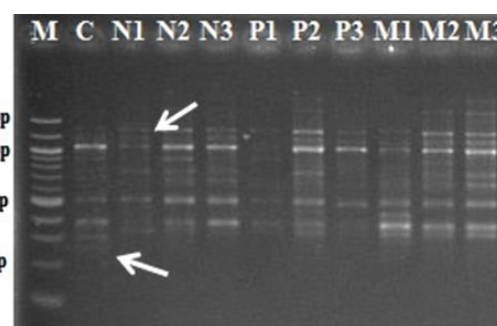
المعاملات									السيطرة	حجم الحزمة	اسم البادئ
كبريتات البوتاسيوم			سوبر فوسفات الكالسيوم الثلاثي			سماد اليوريا					
M 3	M 2	M 1	P 3	P 2	P 1	N 3	N 2	N 1	C		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	400 bp	OP-E20
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1300 bp	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1300 bp	OPH-14
+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	850 bp	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1200 bp	OPA-11
-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	210 bp	
+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	850 bp	OPQ-20
-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	600 bp	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	550 bp	OPN-16
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	450 bp	

+ ظهور حزمة جديدة , - غياب حزمة موجودة



الشكل (12): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية ال RAPD-PCR للبادئ OPH-14 المرحلة على هلام الاكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي القياسي ل DNA نبات الكرفس المعامل بالاسمدة الكيميائية. السيطرة (C), سماد اليوريا (N3,N2, N1), فوسفات الكالسيوم الثلاثي (P3,P2,P1), كبريتات البوتاسيوم (M3,M2,M1).

اظهر البادئ (OPH-14) حزم متعددة متماثلة ومختلفة الاحجام لنبات الكرفس المعامل بالاسمدة الكيميائية بالمقارنة مع النبات الغير معامل حيث اظهرت نتائج ال RAPD للبادئ المذكور ظهور حزم جديدة ل DNA النباتات المعاملة بالمقارنة مع DNA النباتات الغير معاملة حيث نلاحظ ان الحزمة ذات الوزن الجزيئي (850) زوج قاعدي كانت موجودة في مجموعة السيطرة لكن اختفت عند معاملة النبات الكرفس بسماد اليوريا عند المعاملة الاولى والمعاملة الثالثة لسماد فوسفات الكالسيوم الثلاثي.



الشكل (11): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية ال RAPD-PCR للبادئ OP-E20 المرحلة على هلام الاكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي القياسي ل DNA نبات الكرفس المعامل بالاسمدة الكيميائية. السيطرة (C), سماد اليوريا (N3,N2, N1), فوسفات الكالسيوم الثلاثي (P3,P2,P1), كبريتات البوتاسيوم (M3,M2,M1).

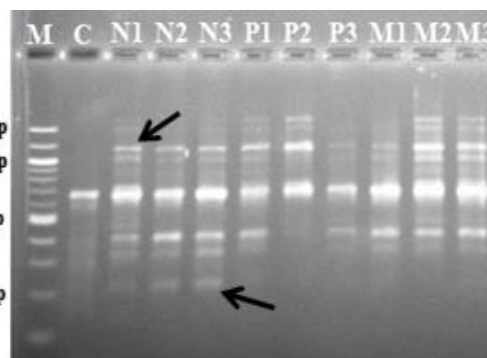
اعطى البادئ (OP-E20) حزم متعددة متماثلة ومختلفة الاحجام لنبات الكرفس المعامل بالاسمدة الكيميائية بالمقارنة مع النبات الغير معامل حيث اظهرت نتائج ال RAPD للبادئ المذكور ظهور حزم جديدة ل DNA النباتات المعاملة بالمقارنة مع DNA النباتات الغير معاملة حيث نلاحظ ان الحزمة ذات الوزن الجزيئي (400) زوج قاعدي كانت موجودة في مجموعة السيطرة لكن اختفت عند معاملة النبات الكرفس بالانواع الثلاثة من الاسمدة الكيميائية ولكافة المعاملات.

كذلك الحال بالنسبة لاختفاء حزمة كانت موجودة في نمط ال RAPD لل DNA العينة النباتية الغير معاملة حيث تختفي مواقع ارتباط البادئ التي كانت موجودة مما يؤدي الى عدم ظهور الحزمة التي كانت موجودة (40) والذي يمكن ان يقود الى الاعتقاد بان هذه الحزم ناتجة من تأثير اضافة الاسمدة الكيميائية الى نبات الكرفس والتي ادت الى تغيرات في DNA نبات الكرفس.

اثبتت نتائج هذه الدراسة ان هناك تأثير واضح للأسمدة الكيميائية المستخدمة على DNA نبات الكرفس بالمقارنة مع DNA النبات الغير معاملة حسب نتائج تقنية ال RAPD للبادئات المستخدمة. هذه النتائج تشير الى ان نبات الكرفس قد تأثر بالأسمدة الكيميائية المضافة الى التربة على مستوى ال DNA والذي تمثل بفقدان حزم كانت موجودة في DNA النبات الغير معاملة وظهور حزم جديدة في DNA النبات المعاملة بالأسمدة الكيميائية وحسب نوع البادئ المستخدم في تقنية ال RAPD. بالإضافة الى امكانية الاعتماد على التغيرات الحاصلة في نمط تقنية ال RAPD كدليل على تأثير الاسمدة الكيميائية على DNA نبات الكرفس والذي يمكن ان يقود الى الاعتقاد بان تلك الاسمدة الكيميائية يمكن ان تسبب طفرات وتغيرات في تسلسل ال DNA خصوصا اذا اضيفت بكميات كبيرة.

تأثير إضافة الأسمدة وتداخلاتها في صفات المادة الفعالة لنبات الكرفس.

توضح الشكل التقسيمي (14) توضح أن هناك تداخلات معنوية بين تراكيز الأسمدة المختلفة اذ كانت هنالك تأثيرات متداخلة ما بين انخفاض وزيادة في تراكيز المواد الفعالة السابقة بتأثير هذه المعاملات المتداخلة وكانت مجمل هذه التداخلات هو تفوق المعاملة (النتروجين والفسفور) بأعلى تراكيز اذ بلغت 148.22 Mg/ml و 5-8- 142.96Mg/ml للمعاملة P₁ وبلغت Eugeniacid للمعاملة N₁ بينما كانت المادة الفعالة Cinnamic acid اذ بلغت 166.71Mg/ml في معاملة المقارنة جدول (5)



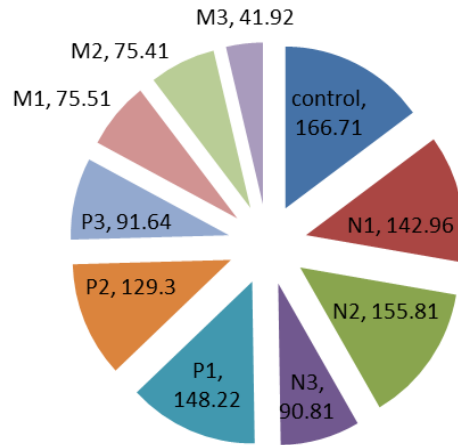
الشكل (13): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية ال RAPD-PCR للبادئ OPA-11 المرحلة على هلام الاكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي القياسي ل DNA نبات الكرفس المعامل بالأسمدة الكيميائية. السيطرة (C), سمد اليوريا (N3,N2, N1), فوسفات الكالسيوم الثلاثي (P3,P2,P1), كبريتات البوتاسيوم (M3,M2,M1).

من النتائج المبينة في الجدول (4) والشكل (11,12,13) يمكن القول ان معاملة نبات الكرفس بالأنواع الثلاثة من الاسمدة الكيميائية سبب اختلافا واضحا في نتائج تضاعف ال DNA باستخدام تقنية ال RAPD بالمقارنة مع النبات الغير معاملة من حيث عدد حزم الناتجة حيث ظهرت حزم جديدة بعد المعاملة بالأسمدة الكيميائية كما هو الحال في الحزمة ذات الوزن الجزيئي (1200) زوج قاعدي للبادئ (OPA-11) واخفتت حزم كانت موجودة قبل المعاملة وهذا يعود الى حصول تغيرات تركيبية في تسلسل ال DNA والتي تشمل (التكسير breaks, فقدان deletions, العبور transpositions والسخ) (37,38) وتغير في مواقع ارتباط البادئ وتنوع في فعالية انزيم البلمرة Taq DNA polymerase والتي يمكن ان تنتج عن وجود المركبات الكيميائية الموجودة في الاسمدة الكيميائية (39). من ناحية اخرى, نلاحظ ظهور حزم جديدة عند المعاملة بالأنواع الثلاثة للأسمدة الكيميائية كما وظهرت حزم جديدة عند المعاملة بأحد الأنواع الثلاثة في حين لم تظهر بالأنواع البقية وهذا يمكن ان يفسر على اساس ان بعض اماكن ارتباط البادئات اصبحت ملائمة للارتباط او بمعنى اخر ظهور مواقع ارتباط جديدة للبادئ بعد المعاملة بالأسمدة الكيميائية.

جدول (5) تراكيز المواد الفعالة Mg/ml في اوراق نبات الكرفس

المعاملات	نوع المادة الفعالة	تركيزه Mg/ml
Control	Cinnamic acid	166.71
N ₁	Eugeniacid	142.96
N ₂	caffeoylquinic acid	155.81
N ₃	5-p-trans-coumaroyl quinic acid	90.81
P ₁	5-8-dimethoxypsoralon	148.22
P ₂₁	Limonene	129.30
P ₃	Isotravidin	91.64
M ₁	Sedonolide	75.51
M ₂	Lunular in	75.41
M ₃	Ferulic acid	41.92

ومن هذه الدراسة نستنتج تأثير إضافة الأسمدة معنويًا في زيادة تراكيز البوتاسيوم والصوديوم والمغنسيوم ونسبة الزيت والمواد الفعالة للنبات. وكذلك تم الحصول على نتائج أفضل عند زيادة تراكيز الأسمدة. كما وجد قدرة تقنية الـ RAPD على تحديد أو الكشف عن الاضرار التي يمكن ان تحدثها الاسمدة الكيميائية المضافة للتربة على DNA النباتات ومنها نبات الكرفس ولذلك يمكن القول ان هذه التقنية يمكن ان تستخدم بنجاح في الكشف عن الملوثات البيئية التي تسبب الاضرار الوراثية للنباتات ومن ناحية اخرى اشارت هذه الدراسة ان للأسمدة الكيميائية اضرار وراثية وكيميائية على النباتات لذلك يجب الالتزام بالكميات والافواقات الدقيقة عند اضافتها الى التربة.



شكل (14) المركبات الفعالة لنبات الكرفس Mg/ml

المصادر

11- وفاء شومان , حسن غزال, سها أشتر , مايكل بوم. التنوع الوراثي في الشعير السوري باستخدام مؤشرات الـ RAPD . نشرة بحثية رقم (99), مركز بحوث كلية الزراعة، جامعة الملك سعود، ص (33-5) 1421هـ.

12- جنان قاسم حسين , البعد الوراثي لأنواع ورد باستخدام RAPD . مجلة العلوم الزراعية العراقية. (2)42: 71-79, 2011.

13- Aly, A. A., Application of DNA (RAPD) and ultrastructure to detect the effect of cadmium stress in Egyptian clover and Sudan grass plantlets. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 8 No. 1 2012, pp. 241-257.

14- Ilhan dogani, kekec, ibrahim ilker ozyigit and mehmet serdal sakcali . salinity induced changes in cotton (*Gossypium Hirsutum* L.). Pak. J. Bot., 44: 21-25, Special Issue March 2012.

15- Page, A.L., R.H. Miller and D.R. Keeny. 1982. Methods of soil analysis part 2, 2nd(ed). Agron Pub.9, Madison, Wisconsin, USA. P.403-429.

16- الصحاف , فاضل حسين (1989). تغذية النبات التطبيقي. بيت الحكمة . جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.

17- Black, C.A. (1985) . Methods of soil Analysis. Part 2.

18-A.O.A.C.(1980) . Official Method of analysis of Association of Agriculture Chemist Washington, D.C, PP 1015.

19-Matt , J.(1970) . Calorimetric Determination of phosphorus in Soil and plant Material with Ascorbic acid . Soil . Sci. 109 : 219-220 .

20-Richards, L .A . (1954). Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils . A.S.D.A Handbook, No. 6, USA.

21-Permingeat, H.R., M.V. Romagnoli and R.H. Vallejos (1998). A Simple Method for Isolating High Yield and Quality DNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Leaves. Plant Molecular Biology Reporter, 16 : 1-6.

1- March, M. D. (1998). PDR for herbal medicines. 1st (end) medical economics co. Moatvale. New Jersey. Pp: 341-373. Teny, C. M. (1988). Inhibition of platelet aggregation by apigenin from *apium graveolens*, Asia pacific J. pharmacol. , 1: 85 – 89.

2- Chakravarty, H. L. (1976). Plant Wealth of Iraq. Vol. 1. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad, Iraq.

3- Bjeldanes, L. F. and I. S. Kim, (1977). Pthalide components of celery essential oil. J. Org. chem., 42: 2333 – 2335.

4- Newell, C. A. (1996). Herbal medicine, a guide for health care professional. The pharmaceutical press, London, pp: 65 – 66.

5- مجيد، سامي هاشم، و محمود، مهند جميل (1988). النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي. دار الثورة للصحافة والنشر، بغداد، العراق، ص 15.

6- سعيد، منصور بن سليمان (2003). علم العقاقير. دمشق، سوريا، ص 916.

7- ابو ضاحي، اليونس، يوسف محمد ومؤيد احمد (1988). دليل تغذية النبات. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - جمهورية العراق.

8- النعيمي ، سعد الله نجم عبد الله . 1999. الأسمدة وخصوبة التربة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل.

9- Mengel, K., and E.A. Kirkby. 1982. Principles of plant nutrition 3rd ed. International. Potash. Institute. Bern. Switzerland.

10- Narayanan Mathiyazhagan and Devarajan Natarajan. Optimization of RAPD-PCR Protocol to Screen *Jatropha Curcas* and *Gossypium Hirsutum* Grown in Metal Contaminated Soil. J Pet Environ Biotechnol 2012, 3:1.

- 33- عسكر، اسين حسين (2014). معالجة مياه الصرف الصحي بالطرائق الفيزيائية ودراسة تأثيراتها المظهرية والفلسجية والتشريحية في نباتي الكرفس *Apiumgraveolens L.* والفجل *Raphanussativus L.* رسالة الماجستير، كلية العلوم، جامعة تكريت، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق.
- 34- Keshan,U. and Mukherji,S.(1992).Effect of cadmium toxicity on chlorophyll content,Hill activity and chlorophyllase activity in *Vigna radiata* leaves. *Indian Journal of Plant Physiology*(3):225-230.
- 35- الراشدي، حسين صابر محمد علي(2009). تأثير التلوث البيئي على بعض النباتات النامية في مناطق ملوثة بالعناصر الثقيلة في محافظة نينوى. اطروحة دكتوراة، كلية التربية-جامعة تكريت.
- 36- سرهيد، محمد محمود (2012). تأثير إضافة الأسمدة العضوية للتربة والرش بمستخلص الأعشاب البحرية *kelpak* و *Ultra kelp40* في النمو والمواد الفعالة لنبات الكرفس (*Apium graveolens L.*) رسالة الماجستير، كلية الزراعة، جامعة تكريت، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق.
- 37- توفيق، ورفاء فائز (2015). تأثير إضافة الحديد المخليبي والسبانويكتريا وتداخلتهما في النمو والمواد الفعالة لنبات الكرفس (*Apium graveolens L.*) رسالة الماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة تكريت، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق.
- 38 - Atienzar FA, Cheung VV, Jha AN, Depledge MH. Fitness parameters and dna effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol Sci* 2001; 59: 241-50.
- 39- Becerril C, Ferrero M, Castaño A. Detection by RAPD of genetic alterations in vitro: amplification and conservation conditions of DNA extracts. *Toxicol Mech Methods* 2002; 12(2): 155-67.
- 40- De Wolfe H, Blust R, Backeljau T. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat Res* 2004; 566(3): 249-62.
- 41- Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase. *Science* 1996; 272: 1646-49.
- 22- Willams, J.G.K., A.R. Kublik, K.J. Livake, J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18 : 6531-6535.
- 23-Sambrok, J.A.D.W.R. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed.
- 24- طيفور ، حسين عوني ورزكار حمدي رشيد (1990). المحاصيل الزيتية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جمهورية العراق.
- 25-Nishizawa, H.; S. Okimura, and Y. Abe, (1991).Application liquid particle extraction to the purification of glycyrrhizin. *Chemical pharm. Bull.* 39. 969 -971.
- 26- Weerachai, P.; and B. Duang (1998). Simple isolation and purification of glycyrrhizic acid. *J. Sci. Fac.*,25:87-91.
- 27- Wiley-VCH, Weinheim. doi: 10.1002/ 14356007. a17-265.d:
- 28- Keshan, U. and Mukherji, S.(1992). Effect of cadmium toxicity on chlorophyll content, Hill activity and chlorophyllase activity in *Vigna radiata* leaves. *Indian Journal of Plant Physiology*(3):225-230.
- 28- الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، عبد العزيز (2000) تصميم وتحليل التجارب الزراعية . دار الكتب ، جامعة الموصل ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جمهورية العراق .
- 29- إبراهيم، سهلية عائد. 1983. تأثير كميات من النتروجين والفسفور على الحاصل ومكوناته وصفاته النوعية وبعض الصفات الحقلية لمحصول زهرة الشمس .
- 30- Schippers, R.R.2000. African indigenous vegetable. Pp. 56-60. An Overview of the cultivated species. Chatthan, U.K., N.R/ACO.EU.
- 31- Laue, W.; Thiemann, M.; Scheibler, E. and Wiegand, k. w.(2006). Nitrates and nitrites in Ullmanns encyclopedia of industrial chemistry,
- 32- عبد الكريم، هشام عبد الوهاب (2013). تأثير تراكيز مختلفة من الحديد المخليبي (EDDHA Fe) في نمو ثلاثة أصناف من الباقلاء *Vicia faba L* . مجلة ديالى للعلوم الزراعية.12(3):148-154.

The impact of the use of some chemical fertilizers on some physiological and genetic traits and some active substances to assess the celery plant (*Apium graveolens* L.)

Ibrahim Omar Saeed

Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, Tikrit, Iraq

E. mail: Dr.ibrahim1977 @ yahoo.com

Abstract

Experiment conducted Alsnaddein capacity (5 kg) in the agricultural season in 2013 on the local plant celery *Apium graveolens* L. To determine the efficiency of the use of different levels of fertilizer nitrogen, phosphorus and their interaction on the physiological and genetic traits active substances to plant celery, and use the design of global experience Factorial Experiment using three levels of nitrogen in the form of urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (N% 46) and three levels of phosphorus in the form of fertilizer Super triple calcium phosphate $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (P₂O₄% 45) and three levels of nitrogen and phosphorus in the form of mixed fertilizer, said results of the study as follows : effect of nitrogen fertilizer when the transaction N1 significant increase in potassium, sodium, magnesium, oil content and the percentage of active substances of plant concentrations were (2.140,1.570, 23. 413, 0.428, 0.281, 1.476,21.353) respectively. Significant decrease was also noted in recipes chlorophyll a and chlorophyll b and the total chlorophyll concentrations at the treatment of different fertilizers. The RAPD technique results also showed eleven initially clear difference in the number of DNA packs multiplying and clear contrast in molecular weights.