جامعة الموصل
كلية العلوم

التحول الوراثي لنباتات البروكلي ببلازميدات Ri المعزولة من سلالتين من *Agrobacterium rhizogenes* وانعكاسه في مستويات مركب السلفورافان

صفوان جاسم سلطان الحديدي

رسالة ماجستير
علوم الحياة / علم النبات

بإشراف

الأستاذ المساعد
الدكتور أمجد عبد الهادي محمد

1442هـ 2020م

الخلاصة

نجحت الدراسة الحالية في انتاج نباتات البروكلي (*Brassica oleracea* var. italica) من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية لبادراتها وأقلمتها إلى التربة. وأوضحت النتائج تباين نسب استحداث الكالس بتباين نوع منظمات النمو النباتية Naphthalene acetic acid (NAA)، 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)، Indole-3-butyricacid (IBA)، Benzyl adenine (BA) وتراكيزها المستخدمة في هذا البحث. وكان لتداخل IBA مع BA الدور البارز في زيادة نسب الاستحداث، حيث تفوق وسط Murashige and Skoog (MS) الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA بتسجيله نسبة استحداث 100% من قطع السيقان تحت الفلقية بعد 11 يوماً من الزراعة، وباستمرار نموه أنتج مزارع كالس نموذجية. وأدت ادامة الكالس على ذات الوسط إلى التكوين التلقائي للأفرع الخضرية بلغ عددها 142 فرعاً ناتجة من 50 قطعة كالس. جذرت تلك الأفرع الخضرية المتمايزة بسهولة في وسط MSO بكامل قوته التركيبية بنسبة 100%، ومع استمرار نموها وتكوينها مجاميع جذرية كفوءة تمت أقلمتها بنجاح إلى التربة ضمن سنادين في البيت الزجاجي.

وتطرقت الدراسة الحالية إلى الكشف عن قدرة بلازميدات Ri المعزولة من سلالتي R1601 وATCC15834 لبكتريا *Agrobacterium rhizogenes* بعد مدد تحضين مختلفة كلٌ على حدا في احداث التحول الوراثي لنباتات البروكلي. وأبدت نتائج حقن تلك البلازميدات مباشرة في قطع السيقان تحت الفلقية والأوراق المعزولة من البادرات بعمر 15 يوماً إلى استجابة قطع الاوراق فقط وتجسدت في نشوء الجذور الشعرية. وأظهرت النتائج تفوق التركيز 1385.5 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ من بلازميدات السلالةR1601 في استحداث الجذور الشعرية بنسبة 54.5% بعد 12 يوماً من التلقيح. في حين ارتقى التركيز 1084.4 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ للبلازميدات المعزولة من السلالة ATCC15834 في تحفيز الجذور الشعرية على جميع تراكيز السلالتين وبنسبة 66.6% بعد 8 أيام فقط من تلقيحها.

واستمرت جميع أنماط الجذور الشعرية بعد استئصالها منفردة او بهيأة خصل ووضعها على وسط MSO الصلب كل منها على حدا بالنمو وتكوينها مزارع جيدة. ومن الملاحظات البارزة في هذه الدراسة هو عدم حدوث تلوث بكتيري لأي من الجذور الشعرية أو مزارعها.

واتصفت مزارع الجذور الشعرية بسرعة نموها، سلبيتها للانتحاء الأرضي ولونها الأبيض. وكشفت هذه الجذور عن قدرتها لاستحداث الكالس عند وضعها على وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ IBA و 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA وتفوقت الجذور المستحثة بفعل التركيز 1084.4 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ من بلازميدات السلالة ATCC15834 في تكوينها للكالس الذي بدأ بهيئة تضخمات على الجذور تطورت لاحقاً إلى كتل كبيرة من الكالس منتجة مزارع نموذجية، ولوحظ اعادة تكوين جذور شبيهه بالجذور الشعرية مرة ثانية على الكالس وبكافة أنواعه.

ونجحت الدراسة في اثبات حدوث التحول الوراثي اعتماداً على دلائل المستوى الجزيئي، إذ عزل الحامض النووي الصبغي Deoxyribonucleic acid (DNA) من أنسجة الجذور الشعرية وكالس بعض أنواعها. ووجدت القراءات تفوق تراكيزه في العينات المحولة وراثياً عن عينات المقارنة. وكذلك أكدت نتائج الترحيل الكهربائي للحامض DNA المعزول من الجذور الشعرية المستحثة بفعل بلازميدات السلالة R1601 بتركيزيها 1385.5 (وكالسها)، 1094.5 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ والمضخم بتقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase chain reaction (PCR) وجود حزمة واحدة لكل منها حجمها 850 زوج قاعدة (base pair) يماثل حجم البادئ المتخصص المستخدم لجين *rol* B. وبصورة مماثلة أظهر الترحيل الكهربائي في هلامة أخرى لنتائج تضخيم الحامض DNA المعزول من الجذور الشعرية المستحثة بفعل بلازميدات السلالة ATCC15834 بتراكيزها 1237.4 (وكالسها)، 1697.4، و1084.4 (وكالسها) نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ وجود حزمة واحدة بحجم 248 زوج قاعدة وهو مماثل للبادئ المتخصص لجين *rol* A مع غياب مثل هكذا حزم من الحامض DNA المضخم والمعزول من عينات المقارنة.

ولارتباط سمة انتاج مركب السلفورافان مع نبات البروكلي فقد تطرقت الدراسة إلى تقدير كمياته في الانسجة المختلفة بتقانة كروماتوكرافيا السائل العالي الاداء High performance liquid chromatography (HPLC). وأظهرت قراءآت زمن الاحتباس ومساحة المنحني ارتقاء أنسجة كالس السيقان تحت الفلقية للبادرات باحتوائها على 44.14 مايكروغرام مل$^{-1}$ وهو يمثل عدة اضعاف كميته الموجودة في مستخلصات المجموع الخضري لكل من البادارت (المقارنة) والمتمايز من الكالس اذ بلغ 4.13، 6.56 مايكرو غرام مل$^{-1}$ على التوالي. في حين تفوقت الجذور الشعرية في كميات السلفورافان المقاسة عن كمياته في جذور البادرات (المقارنة) البالغة 1.26 مايكروغرام مل$^{-1}$، وكانت أعلى كمية له 2.90 مايكروغرام مل$^{-1}$ في مستخلصات الجذور الشعرية المستحثة ببلازميدات Ri المعزولة من السلالة ATCC15834 ذات التركيز 1084.4 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$.

ABSTRACT

The current study succeed in production of broccoli plants (*Brassica oleracea* var. italica) from the differentiation of hypocotyl stems callus of its seedlings and their adaptation to the soil. The results showed difference in ratio of callus initiation with different type of plant growth regulators Naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Indole-3-butyric acid (IBA), Benzyl adenine (BA) and their concentrations which used in this study. The interaction of IBA and BA had an efficient role of increasing the initiation ratios. Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg L^{-1} IBA and 2.0 mg L^{-1} BA superiority in registered initiation ratio reached 100% from hypocotyl stems segments after 11 days of the cultivation, and with its continues to grow produced typical callus cultures. The continued of callus subculture on the same initiation medium led to spontaneous production of 142 shoots from 50 pieces of callus. These regenerated shoots characterized by easily root formation in the MSO medium with full strength at ratio 100%, and with continues growth and formation of efficient root groups, they were successfully adapted to the soil within the pots in the greenhouse.

The present study examined the ability of Ri plasmid isolated from the R1601 and ATCC15834 strains of *Agrobacterium rhizogenes* after different incubation periods alone in the genetic transformation of broccoli plants. The results of injection those plasmids directly into the hypocotyl stems and leaves isolated from seedlings at 15 days showed the response of leaves pieces only and embodied in the initiation of the hairy roots. Also, The results appeared the exceeded of concentration 1385.5 ng μl^{-1} of the R1601 plasmids in its stimulated ability to develop hairy roots at a ratio 54.5% after 12 days of incubation. Whereas, the concentration 1084.4 ng μl^{-1} for the plasmids isolated from the strain ATCC15834 elevated in stimulation of the hairy roots on all concentrations of the two strains with 66.6% after 8 days only from the incubation start point. All types of hairy roots continued in growthafter

removing individually or in the clusters forms and putting them on the solid MSO medium, each separately in growing and produced a efficient cultures. From the prominent observations in this study is the absence of bacterial contamination for any of the hairy roots or their cultures. The roots of this cultures were characterized by its fast growing, negatively geotropism and its white color. These roots revealed their ability to induce callus from them when placed on the solid MS medium supported by adding 1.0 mg L^{-1} IBA and 2.0 mg L^{-1} BA. Those roots induced by the concentration of 1084.4 ng μl^{-1} of the ATCC15834 strain plasmids superiorly in the callus initiated, the callus began with swelling on the roots, which later evolved into large masses of callus, producing typical cultures. It was observed to reproduced roots like the hairy roots again on callus with all types. The study succeeded in proving the genetic transformation at the molecular level, the Deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated from the tissues of hairy roots and its callus of some types. The data found that its concentrations in the genetically modified samples exceeded on the control samples. The results of the electrophoresis of the DNA isolated from the hairy roots induced by the plasmids of the R1601 strain with its concentration of 1385.5 ng μl^{-1} (and its callus), 1094.5 ng μl^{-1} were they amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technology, confirmed the presence of one band with size of 850 base pairs for each is identical to the size of the specific primer used for the *rol* B gene. Similarly, the electrophoresis in another gel showed the results of DNA amplification isolated from hairy roots induced by plasmids of the ATCC15834 strain with their concentrations 1237.4 (and their callus); 1697.4; 1084.4 (and its callus) ng μl^{-1} and the presence of one band with 248 base pairs at size is similar to the specific primer of *rol* A gene, with absence of those bands of DNA amplified and isolated from the control samples. For correlate the production of sulforaphane with the broccoli plant, the study touched on estimating its quantities in different tissues with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technology. The observations of

datas of the retention time (RT) and the area of the curve showed the elevation of the callus tissue for the seedlings hypocotyl stems with 44.14 μg ml^{-1}, which represents several times what is found in the extracts of the shoot group of both seedlings (control) and shoot group differentiated from callus, They reached 4.13 and 6.56 μg ml^{-1} respectively. Whereas the hairy roots in the measured quantities of sulforaphane exceeded its quantities on the seedlings roots (control) of 1.26 μg ml^{-1}, and the highest amount was 2.90 μg ml^{1} in extracts of hairy roots induced via Ri plasmids isolated from the ATCC15834 strain with concentration 1084.4 ng μl^{-1}.

University of Mosul

College of Science

Genetic Transformation of Broccoli Plants via Ri Plasmids Isolated From Two Strains of *Agrobacterium rhizogenes* and its Reflection in Sulforaphane Compound Levels

Safwan Jasim Sultan Al-Hadidy

M.Sc. Thesis

In

Biology / Botany

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed

1442 A.H. **2020 A.D.**