جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

تحديد مستوى التعبير لجين *CYC-B* في أنسجة نبات الطماطم *Solanum lycopersicum* والمتأثر بجينات *rol*

مشهد محمد علي عبدالله علي الخضرلك

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم النبات

بإشراف

الأستاذ الدكتور

أمجد عبدالهادي محمدعلي

1447هـ

2025 م

الخلاصة

أفضت الدراسة الحالية الى إنتاج مزارع الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الطماطم *Solanum lycopersicum* وتمايز الافرع الخضرية، وإخضاعه للتحول الوراثي ببلازميدات Root inducing plasmids (pRi) المعزولة من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 بوساطة تقانة الحقن المباشر ،وتحديد نشاط التعبير للجين Chromoplast-specific lycopene beta-cyclase (*CYC-B*) بتقانة التفاعل البوليميرازي المتسلسل للنسخة العكسية Real time- polymerase chain reaction (RT-PCR) وكذلك قياس تركيز مُركّبي الليكوبين والبيتا–كاروتين في أنسجة النبات.

واظهرت نتائج زراعة بذور نبات الطماطم على وسط Murashige and Skoog (MS) الصلب إنباتاً جيدا بنسبة 100% بعد 5 ايام مُنتجة بادرات نامية ذات حيوية جيدة. وتم استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية للبادرات على وسط MS الصلب والمدعم بإضافة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) بنسبة بلغت 100% بعد سبعة ايام من الزراعة وبعد استئصال كتل الكالس المستحدثة واعادة زراعتها انتجت مزارعه بعد 25 يوماً. ومن النتائج المميزة ظهور نموات خُضرية تلقائياً بعد 6 أيام من إعادة الزراعة الاولى للكالس التي تطورت لاحقاً إلى أفرع خُضرية بأعداد كبيرة بلغ معدلها سبعة أفرع لكل قطعة كالس وبمعدل طول 3.2 سم وبنسبة 85% بعد 20 يوماً.

تطرقت الدراسة الحالية إلى التحري عن قدرة بلازميدات Ri المعزولة من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 بعد مدد تحضين مختلفة وحدها في إحداث التحول الوراثي لنباتات الطماطم. وأدت نتائج حقن تلك البلازميدات مباشرة في قطع السيقان تحت الفلقية للبادرات بعمر 15 يوماً إلى استجابتها ونشوء الجذور الشعرية، مع تفوق التركيز 123.8 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ من الناقل البلازميدي في تحفيز أعلى نسبة بلغت 75% بعد6 أيام من التلقيح. واستمر نمو الجذور الشعرية بعد استئصالها مُنفردة أو بهيئة تجمعات ووضعها على وسط MS free from plant growth regulators(MSO) الصلب وتكوينها مزارع جيدة، إذ اتّصفت هذه الجذور بسرعة نموها ولونها الأبيض وسلبيتها للانتحاء الأرضي.

وادت نتائج الدراسة الى بيان دور الدقائق النانوية لأوكسيد النحاس في زيادة نسب التحول الوراثي واظهرت بيانات هذا المحور نتائج مميزة ، اذ عند اضافة 5 مايكروغرام مل$^{-1}$ من أوكسيد النحاس إلى

بلازميدات Ri بتركيز 123.8 نانوغرام ميكرولتر$^{-1}$ حفزت بشكل كبير تكوين الجذور الشعرية مقارنة بإضافة 10 مايكروغرام مل$^{-1}$، بدلالة النسب المئوية البالغة 80 و 67.5٪ بعد 5 و 6 أيام على التوالي.

اظهر فحص الترحيل الكهربائي في الأكاروز 1% لنواتج التفاعل البوليميرازي التسلسليPolymerase Chain Reaction (PCR) لأنواع الحمض النووي المُستخلص من أنسجة نبات الطماطم الناتجة من التلقيح دليلاً بيولوجياً جزيئياً لوجود جين *rol* A. إذ اظهرت قطعة الهلام انفصال حزمة واحدة بوزن جزيئيbp 248 وهو ما يماثل الوزن الجزيئي للبادئ المتخصص المستخدم لجين *rol*A، وغياب انفصال نظيراتها من الحمض النووي DNA المُضخم والمُستخلص من عينة خلايا جذور البادرات وهذا ما يُعدُّ دليلا لنجاح التحول الوراثي. وبعد تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للحمض النووي المستخلص من العينات المحولة وراثياً ومقارنتها ببنك الجينات العالمي التابع للمركز العالمي للتكنولوجيا الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI)، سجلت لاول مرة كصنفين جديدين لنبات الطماطم وكالآتي: *Solanum lycopersicum* cultivar Mutant 1 with the accession number PV412943, *Solanum lycopersicum* cultivar Mutant 2 with the accession number PV412944.

وكشفت النتائج عن التباين في نسبة الليكوبين والبيتا–كاروتين المستخلصة من الانسجة المختلفة لنبات الطماطم فقد تفوقت انسجة الافرع الخضرية الناتجة عن تلقيح قطع السيقان تحت الفلقية بالناقل البلازميدي Ri ذي التركيز 123.8 المعزول من البكتريا وبلغت 3.981 ، 1.387 ملغم 100غرام$^{-1}$ على التوالي على باقي الانسجة المحولة وراثيا، وكذلك وجدت الزيادة في كمياتهما المستخلصة ضمن الساعة الثالثة من كالس السيقان تحت الفلقية النامي على وسط MS الصلب الحاوي على 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D بمقدار 3.615 ، 1.301 ملغم 100غرام$^{-1}$ على التوالي،وهذا ما اكدته نتائج التعبير لجين *CYC-B*.

Abstract

The current study successfully produced callus cultures from hypocotyl explants of the tomato plant *Solanum lycopersicum*, induced shoot differentiation, and subjected them to genetic transformation using root-inducing plasmids (pRi) isolated from *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 via direct injection. The study also aimed to determine the expression activity of the Chromoplast-specific lycopene beta-cyclase (*CYC-B*) gene, using Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technology, and to measure the concentration of lycopene and beta-carotene in its different tissues.

The results of tomato seed cultivation on solid Murashige and Skoog (MS) medium showed good germination at a rate of 100% after 5 days, producing vigorous seedlings with distinct characteristics on the solid medium. Callus was induced from hypocotyl explants of the seedlings on solid MS medium supplemented with 2.0 mg L^{-1} of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at a rate of 100% after seven days of cultivation. Subculturing the developed callus masses resulted in established cultures after 25 days. Notably, spontaneous vegetative growth appeared after 6 days of the second subculture of the callus, which later developed into numerous shoots with an average of seven shoots per callus and an average length of 3.2 cm, at a rate of 85% (based on 25 callus pieces that were subcultured) after 20 days.

The current study investigated the ability of Ri plasmids isolated from *Agrobacterium rhizogenes* ATTC15834, after different incubation periods alone, to induce genetic transformation in tomato plants. The results of directly injecting these plasmids into hypocotyl explants of 15-day-old seedlings using direct injection led to their response and the emergence of hairy roots. The concentration of 123.8 ng μL^{-1} of the plasmid vector showed superiority in stimulating the highest percentage of 75% after 7 days of inoculation. The hairy roots continued to grow after their individual or clustered excision and placement on solid MS medium free from plant growth regulators (MSO), forming good cultures. These roots were characterized by their rapid growth, white color, and negative gravitropism.

The study also addressed the role of copper oxide nanoparticles in increasing the rates of genetic transformation, and the data from this axis showed remarkable results. The addition of 5 $\mu g\ mL^{-1}$ of copper oxide to Ri plasmids at a concentration of 123.8 ng μL^{-1} significantly stimulated hairy root

formation compared to the addition of 10 µg mL^{-1}, with percentage rates of 80% and 67.5% after 5 and 6 days, respectively

Electrophoretic analysis on 1% agarose gel of Polymerase Chain Reaction (PCR) products of nucleic acids extracted from different tissues of the tomato plant showed molecular biological evidence for the presence of the *rol A* gene. The gel electrophoresis revealed a single band separation at a molecular weight of 248 bp, which corresponds to the molecular weight of the specific primer for the *rolA* gene. The absence of similar band separation in the amplified DNA extracted from non-transformed seedling root cell samples provides evidence for the successful genetic transformation. After determining the nucleotide sequence of the DNA extracted from the transformed samples and comparing it with the global gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), two new tomato plant cultivars were registered for the first time, as follows: *Solanum lycopersicum* cultivar Mutant 1 with the accession number PV412943, and *Solanum lycopersicum* cultivar Mutant 2 with the accession number PV412944.

The results revealed variations in the lycopene and beta-carotene content extracted from different tissues of the tomato plant. The tissues of the vegetative shoots resulting from the inoculation of hypocotyl explants with the Ri plasmid vector at a concentration of 123.8 isolated from the bacterium showed the highest levels, reaching 3.981 and 1.387 mg $100g^{-1}$, respectively, compared to other transformed tissues. Furthermore, an increase in their extracted amounts was found within the third hour of hypocotyl callus growth on solid MS medium containing 2.0 mg L^{-1} 2,4-D, with values of 3.615 and 1.301 mg $100g^{-1}$, respectively, This was confirmed by the expression results of the *CYC-B* gene.

University of Mosul

College of Science

Dep.of Biology

Determining of the expression level of the *CYC-B* gene in tomato *Solanum lycopersicum* plant tissues that affected by rol genes

Mashhad Mohammad Ali Abdulla Ali AL kheder lak

M.Sc. Thesis

Biology /Botany

Supervised By

Professor Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed Ali

1447 A.H **2025 A.D**