



جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

التغيرات الحاصلة في تعبير جينات الحرارة والبرودة والتعريض لدقائق الزنك
النانوية وزيادة تكوين المركبات الفعالة في كاس الشليك
Fragaria ananassa Duch

وعد محمود جاسم صالح

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

باشراف

الأستاذ

الدكتورة جميلة هزاع رشيد

٢٠٢٥ م

١٤٤٦ هـ

الخلاصة

نجحت الدراسة الحالية في الكشف عن زيادة في التعبير الجيني للمورثات التي تشفر بروتينات الصدمة الحرارية *HSP70* و *HSP90* في كالس نبات الشليك *Fragaria ananassa* Duck النامي على وسط MS موراشيج - سكوك Murashige & Skoog الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ 6-Benzyladenin (BA) و 4.0 ملغم لتر⁻¹ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) المعرض للصدمة الحرارية 45م°/30 دقيقة وبينت النتائج زيادة في تعبير الجين *HSP70* مسجلاً 51.02 قياساً بالجين القياس Beta.H.K الذي سجل 0.442 نتيجة تعرض الكالس للصدمة الحرارية والتي تساهم في إنتاج نباتات شليك متحملة او مقاومة للصدمة الحرارية وتحمي الانسجة النباتية من التحلل والموت . كما تمكنت الدراسة الحالية من الكشف عن الدور الداعم لصدمة التجميد -12 م° لمدة 30 دقيقة في تعبير الجينات المستجيبة للتجميد *CBF4* و *COR47* مسجلاً 26.72 للجين *COR47* و 1.48 للجين *CBF4* ودورها في حماية نباتات الشليك من انخفاض درجات الحرارة وتساهم في تأقلمه مع إنخفاض درجات الحرارة .

اشتملت التجارب لاستحثاث الكالس من اوراق وسيقان بادرات الشليك المعقمة وارتقت أجزاء الأوراق عن السيقان في استجابتها لاستحثاث الكالس على وسط الاستحثاث MS + 1.0 ملغم لتر⁻¹ BA + 4.0 ملغم لتر⁻¹ 2,4-D بعد 16 يوماً من الزراعة واستغرق استحثاث كالس السيقان في نفس الوسط 22 يوماً . وسجلت مدة استحثاث الكالس من أجزاء الأوراق على الوسط MS + 1.0 ملغم لتر⁻¹ BA + 4.0 ملغم لتر⁻¹ NAA 22 يوماً واتصف كالسها ببنيته الهشة ولونه الأصفر . نجح وسط MS الحاوي على 4.0 ملغم لتر⁻¹ 2,4-D + 8.0 ملغم لتر⁻¹ BA في تكوين الافرع الخضرية وامتازت بكثافة نمواتها وقصر سيقانها ، بينما تعذر تجذيرها بوجود IBA و NAA .

أدى تعريض الكالس الى الصدمة الحرارية طويلة المدى (20 دقيقة) وقصيرة المدى (10دقائق) الى زيادة الاوزان الرطبة والمحتوى البروتيني . وادت الصدمة 45م° / 10 و 20 دقيقة لكالس الأوراق الى حصول زيادة كبيرة في وزنه الرطب ومحتواه البروتيني في المرحلتين العمريتين 15 ، 30 يوماً

فضلاً عن زيادة مستويات صبغة الانثوسيانين عند درجة 50°م في المرحلة العمرية 15 يوماً وانخفاض نسبة فيتامين C في عينات الكالس المعرضة للصدمتين الحراريتين القصيرة والطويلة . وأوضحت البيانات أن تعريض الكالس الى صدمة البرودة (صفر مئوي) سببت انخفاضاً في أوزانه الرطبة وارتفاعاً في محتواه البروتيني بعد 20 دقيقة من التعريض مع انخفاض كل من صبغة الانثوسيانين وفيتامين C في جميع المعاملات . ومن النتائج الداعمة للكالس عند تعرضه للموجات الصوتية فوق السمعية بتردد 47.6 KHZ زيادة كتلة الكالس ومحتواه البروتيني ، ووجد أن تعريضه لمدة 40 دقيقة كان الأنسب في دعم هذه المؤشرات ولوحظ تذبذب مستويات صبغة الانثوسيانين في معاملات الصدمات بين الزيادة والنقصان كما بينت النتائج انخفاض مستويات فيتامين C في أنواع الكالس المعرض للصدمة الفيزيائية وعدم تأثرها عن الكالس غير المعرض . ابرزت نتائج تعريض الكالس لمعاملات الصدمة الكهربائية بنمطها القصيرة (10) والطويلة (20) ملي ثانية وبفولتية 200،300،400،500 فولت زيادة الكتلة الحيوية والمحتوى البروتيني ، وانفردت الفولتية 500 فولت في زيادة الاوزان الرطبة للكالس المعرض لانماط الصدمة القصيرة والطويلة اذ بلغ 3.30 و 3.50 غم وازداد المحتوى البروتيني عند الفولتية 400 فولت مسجلاً 2.55 و 2.75 ملغم/غم بعد 30 يوماً من الزراعة ولوحظ ارتفاع مستويات صبغة الانثوسيانين عند 500 فولت في المرحلة العمرية 15 يوماً وانخفاضها الى 0.99 ملغم/غم عند 30 يوماً بعد التعرض مقترنة بانخفاض مستويات فيتامين C في جميع المعاملات .

ومن النتائج المهمة للكالس النامي على وسط MS الصلب المدعم بإضافة كل من 30 ، 60 ، 90 ، 120 مايكروغرام/ملييلتر من الدقائق النانوية لأكسيد الزنك ZnO NPs حصول زيادة في كتلته الحيوية ومحتواه البروتيني وارتقى التركيز 120 مايكروغرام/ملييلتر اذ سجل الوزن الرطب 3.60 غم والمحتوى البروتيني 2.90 مليغرام/غم بعد 30 يوماً من الزراعة ، وسجلت مستويات صبغة الانثوسيانين عند التركيز 90 مايكروغرام/ملييلتر 2.75 ملغم/غم وانخفاض مستوى فيتامين C تدريجياً مع زيادة التركيز .

واظهرت بيانات GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) تأثيرات الصدمات الفيزيائية والكيميائية التي تعرض لها كالس الشليك فقد حددت النتائج العديد من المركبات الكيميائية في الكالس تحت الاجهاد اذ سجلت عينات كالس المقارنة (غير المعرض) 24 مادة كيميائية بينما اظهر الكالس المعرض للصدمة الحرارية وجود 90 مادة كيميائية ، والكالس المعرض للموجات الصوتية فوق السمعية 44 مادة كيميائية ، بينما سجلت المواد المفصولة من الكالس المعرض للصدمة الكهربائية 54 مادة كيميائية . وان التأثير الأكبر كان عند زراعة الكالس على وسط يحتوي على الجزيئات النانوية لأكسيد الخارصين ZnO NPs اذ وصلت اعداد المواد المستحثة 110 مادة كيميائية . كما تناولت الدراسة الحالية انشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الأوراق غير المعامل بأية صدمة في الوسط MS السائل المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر⁻¹ BA + 4.0 ملغم لتر⁻¹ NAA واظهرت الخلايا قابليتها في الانقسام وزيادة اعدادها لتسجل كثافتها في اليوم الرابع من عمر المزرعة 56.1 × 10⁴ خلية/مل ، وادت زراعتها بطورها في قطرات الاكار المتعددة Multiple (MDA) drop arrays باعتماد المزارع الصلبة-السائلة في انتاج اعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية وتطور معظمها الى بادئات الكالس والتي انتجت منها مزارع الكالس .

Summary

The current study succeeded in detecting the genetic expression of *HSP70* and *HSP90* genes encoding the heat shock proteins in callus of Strawberry *Fragaria ananassa* Duch grown on agar solidified Murashige & Skoog (MS) medium containing 1.0 mg L^{-1} 6-Benzyladenin (BA) and 4.0 mg L^{-1} 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) . exposed to heat shock $45^{\circ}\text{C} / 30 \text{ min}$.The results showed an increase in gene expression of *HSP70* gene, approached 51.02 compared to the control gene Beta.H.K, which approached 0.442 . as a result of exposing the callus to heat shock, which contributes to the production plants that are tolerant or resistant to the heat shock, which preserves plant tissues from decomposition and death. Again this study succeeded in detecting the supportive role of freeze shock -12°C for 30 min in the expression of the freezing-responsive genes *CBF4* and *COR47*, which they have a major role in protecting Strawberry plants from the drop in temperature, this is supporting plant cells from death and decomposition, and making the plant acclimatized to the drop in temperature.

Experiments included the induction of callus from leaves and stems, leaf explants showed better responses in callus formation from stem explants on $\text{MS} + 1.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA} + 4.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2,4-D}$, medium after 16 days . The induction of callus from stems in the same medium took 22 days. The period of callus development from leaf explants on $\text{MS} + 1.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA} + 4.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ medium involved was 22 days. And it was friable and yellow in color. MS medium, supplemented with $4.0 \text{ mg L}^{-1} + 8.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA}$ succeeded in shoot regeneration which were distinguished by their dense growth and short stems, while the formation of root of these shoots were failed in the presence of IBA and NAA .

Exposing callus to long- and short-term heat shock (10 and 20 minutes) increased fresh weights and protein content. Exposure to 45 °C/10 and 20 minutes of callus increased the fresh weight and protein content of callus in the two age stages 15 & 30 days in addition to increasing level of anthocyanin pigment at 50°C at the 15-day age stage, and decreasing the percentage of vitamin C in both short and long term heat shocks , Exposing callus to cold shock (0°C) led to a decrease in fresh weight and an increase in protein content after 20 minutes of exposure both anthocyanin and vitamin C decreased in all treatments. Among the supportive role for callus was when exposed to ultrasonic wave KHz. 47.6 . Increased callus mass and protein content. It was found that the exposure period of 40 minutes was the most appropriate in supporting these indicators. The study found that the anthocyanin levels pointed out of were fluctuated . The results a decrease in levels vitamin C levels in callus exposed to physical shocks and was not affected in non shocked callus that .The results of exposing callus to short and long electric shocks treatment at 10 and 20/msec with 200, 300, 400, and 500 volts showed an increase callus biomass and its protein content. Using 500 volts encouraged the increase callus fresh weight exposed to each short of and long modes, recorded 3.30 and 3.50 grams Protein content at 400 volts reported 2.55 and 2.75 mgg⁻¹ after 30 days of transplantation. Anthocyanin levels increased at 500 volts at the 15-day age stage, then decreased 0.99 mg/g at 30 days after exposure. Moreover the results indicated a decrease in vitamin C levels in all treatments.

Among the interesting results that callus growing on agar solidified MS medium supplemented with each of 30, 60, 90, and 120 mg ml⁻¹ of ZnO NP, All concentrations stimulated an increase of biomass and protein content

II

and the concentration 120 mg ml^{-1} , enhanced fresh weight to 3.60 grams and protein content 2.90 mg gm^{-1} , 30 days after culture, while the levels of anthocyanin at a concentration of 90 micrograms/ml, approached 2.75 mg gm^{-1} . Level of vitamin C gradually decreased with increasing concentration, Both physical and chemical shocks to which Strawberry callus was exposed had a significant impact on the quality of chemicals according to data of gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS), Additionally many chemical compounds were identified in the callus under stress. The control callus samples (samples not exposed to stress) recorded 24 chemicals, While callus exposed to heat shock recorded 90 chemicals, Sonicated callus exposed recorded 44 chemicals, while electro-treated callus exhibited 54 chemicals, The greatest effect was when callus was grown on a medium containing ZnO NP, as the number of induced chemicals was 110 chemicals. Interestingly this study established cell suspensions cultures derived from leaf callus in liquid MS medium provided with 1.0 mg L^{-1} BA + 4.0 mg L^{-1} NAA. Cells expressed their ability to divide and their numbers increased, and their density at the 4th day $56.1 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$. When cultivated by embedding in agar drops MDA using solid-liquid cultures. They produced large numbers of colonies, most of them developed into callus primordia, from which callus cultures were produced.

**University of Mosul
College of Education
For Pure Science**



Alterations in Heat and Cold-Responsive Gene Expression, Zinc Nanoparticles Exposure, and Enhanced Bioactive Compound Production in Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) callus

Waad Mahmood Jassim Salih

Ph.D.Thesis

Biology

Supervised by

Prof.

Dr.Jameela Hazaa Rasheed

2025 A.D

1445 A.H