جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

اخلاف نبات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica من بذوره الصناعية، كالسه وجذوره الشعرية المحولة وراثيا ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 13332 مع عزل البروتوبلاست من أنسجته

رغد محمد عبد الله المولى

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة شفاء مهدي صالح

الأستاذ المساعد

الدكتور قتيبة شعيب النعمة

١٤٤٣هـ

٢٠٢٢م

الخلاصة

انتجت في الدراسة الحالية نباتات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica من تمايز كالس أجزاء بادراتها (الجذور، السيقان والأوراق). فقد نجح كالس الاوراق والسيقان النامية على وسط موراشيج وسكوك (MS) الصلب المدعم بـ 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ 6-Benzyl adenine (BA) و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ Naphthalene Acetic- Acid (NAA) وكالس الجذور النامي على وسط MS المدعم بـ(0.5، 1.5، 2.0) ملغم لتر$^{-1}$ Thidiazuron (TDZ) في التكوين التلقائي للأفرع الخضرية بمرحلة واحدة بعدها تم تجذير هذه الأفرع بسهولة على وسط MSO الصلب الخالي من منظمات النمو وتأقلمت بنجاح. واستحدثت في هذه الدراسة الأجنة الجسمية Somatic embryos من كالس السيقان والجذور وكذلك من قطع السيقان والجذور عند زراعتها وإدامتها على وسط MS الصلب المدعم بـ (0.4 و 0.5) ملغم لتر$^{-1}$ TDZ . وتشكلت من زراعة الأجنة المستأصلة على وسط MSO الصلب الخالي من منظمات النمو أفرعاً خضريةً بلغ عددها 205 فرعاً جذرت بنجاح ويعدّ هذا مساراً مناسباً لإنتاج أعداد كبيرة من نباتات البروكلي.

تمكنت الدراسة الحالية في أحد جوانبها المهمة من إنتاج البذور الصناعية synthetic seeds بإستخدام الأجنة الجسمية والقمم النامية. وأظهرت النتائج ان التركيز 2% الّجينات الصوديومSodium alginate كان ملائماً جداً في اعطاء أعلى نسبة تحولconversion (انبات) للبذور من الأجنة الجسمية بلغت 60 % عند خزنها مدة 7 أيام في 4° سيليزية في حين أعطى تركيز 3% الّجينات الصوديوم اعلى نسبة تحول للبذور الحاوية على القمم النامية وصلت إلى 96 % عند الظروف نفسها (مدة خزن 7 أيام في4° سيليزية) وقد اعتمد التركيز2% لجينات الصوديوم في التجارب لتغليف الأجنة الجسمية والقمم النامية كونه اعطى افضل شكل للبذور الصناعية بهيئة تراكيب كروية (Beads) بتداخله مع 12/ ملغم لتر$^{-}$ كلوريد الكالسيوم المائي$CaCl_2.2H_2O$ المستخدم عامل تصليب للبذور.

وبدى واضحاً من نتائج الدراسة أنّ زيادة مدة الخزن لهذه البذور المصنعة انعكس سلباً على نسبة تحولها التي بلغت ادنى مستوياتها 28 و 52 % عند خزنها مدة 60 يوماً في 4° سيليزية لكل من بذور الأجنة الجسمية والقمم النامية على الترتيب. من ناحية أُخرى كان لزيادة درجة حرارة الخزن اثرسلبي بالغ في نسبة تحول البذور التي انعدمت(0%) عندة خزنها مدة 30 يوماً في حرارة الغرفة 25° سيليزية. كما ان تزويد حشوة البذور الصناعية للأجنة الجسمية بـ 1.0ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA رفع كفاءة انباتها لتصل 68% عند خزنها مدة 7 أيام في 4° سيليزية و 40% في درجة الخزن 25° سيليزية وبذات المدة.

من النتائج الجديرة بالإهتمام المتحققة في هذه الدراسة، الحصول على نباتات البروكلي المحولة وراثياً بواسطة السلالة البرية ATCC13332 *Agrobacterium rhizogenes* و بلازميداتها pRi – DNA (Root inducing plasmid) بتقنيتي الحقن المباشر Direct injection والزراعة المرافقةCo- cultivation إذ بزغت الجذور الشعرية في مواقع التلقيح ومواقع غير ملقحة بعد 7 أيام من حقن الأوراق وبنسبة 81.1% عند إستخدام المعلق البكتيري ذي الكثافة الضوئية OD = 1.6 ، بينما أظهرت نتائج الزراعة المرافقة للأوراق مع بلازميدات مع المعلق البكتيري توافقاً باستحثاث الجذور الشعرية بنسبة أعلى مما هي عليه بالحقن بالبكتريا إذ سجلت 85% .

من النتائج البارزة التي حققتها هذه الدراسة أنّه أثناء إدامة الجذور الشعرية لمدة ثلاثة أشهر على وسط MSO الصلب الخالي من منظمات النمو لوحظ زيادة اقطارها واكتسابها لوناً أخضراً ، وإنّ قِسماً من مزارعها بدأت بالتضخم لتكوين كتل كبيرة من الكالس في وسط MS ووسط Woody Plant Medium (WP) المدعمين بتراكيز مختلفة من TDZ (0.3، 0.5، 0.8، 1.0) ملغم لتر$^{-1}$ كلاً منها على انفراد. وبإستمرار إدامتها على هذه الأوساط كونت أفرعاً خضرية جذرت بسهولة بعد 7 – 9 أيام من نقلها الوسط MSO ونجحت اقلمتها في مزيج التربة والبتموس. وأشارت الدلائل المظهرية لنباتات البروكلي والمتمثلة بقصرها وتغيير شكل أوراقها وتجعدها أنّ هذه النباتات محولة وراثياً . وأيدت إختبارات البيولوجي الجزيئي حدوث التحول الوراثي فقد وجدت القراءات تفوقاً في تراكيز الحامض النووي في العينات المحولة وراثياً مقارنة بعينات المقارنة. كما بينت إختبارات التفاعل التسلسلي البولميرازي polymerase chain reaction(PCR) والترحيل الكهربائي لعينات الاحماض النووية المضخمة وباستعمال البادئات المتخصصة لجينات *rol C* المحمولة على قطعة T – DNA لبلازميد البكتريا إلى احتفاظ أنسجة نباتات البروكلي بهذه الّجينات المسؤولة عن بزوغ الجذور الشعرية وظهورها في هذه النباتات.

أمكن عزل البروتوبلاست من النسيج المتوسط لأوراق نباتات البروكلي *Brassica oleracea* var. italica بإستخدام مجموعة من المحاليل الانزيمية لهضم الجدر الخلوية التي أظهرت تبايناً في كفاءة العزل وتفوق المحلول الانزيمي المتكون من 1.0% Cellulase R – 10 و 0.3% Pectinase وبوجود 10% من المانيتول مستغرقاً 16 ساعة الذي حقق ناتجاً بلغ 20×10^5 خلية مل$^{-1}$ بحيوية 93% واتصف البروتوبلاست بشكله الكروي وتباين توزيع البلاستيدات الخضراء فيه وتراوحت اقطاره بين 15 – 52 مايكروميتر. فضلاً عن ذلك عزل البروتوبلاست من الجذور الشعرية المحولة وراثياً و تفوق المحلول الانزيمي المتكون

من 1.5% Cellulase YC و 0.1% 23 – Pectolyase Y بوجود 13% مانتول مستغرقاً 18 ساعة وسجل ناتج البروتوبلاست 1×10^5 خلية مل$^{-1}$ بحيوية 76%، وامتاز البروتوبلاست المتحرر بشكله الكروي وتراوحت اقطاره 5 – 17.5 مايكروميتر. ولم تنجح جميع المحاولات المتعلقة بزراعة نوعي البروتوبلاست بطريقة الطمر في قطرات الاكاروز بإستخدام الوسطين KM8p وMS المحور.

Abstract

In the present study, broccoli, *Brassica oleracea* var. italica plants was produced from callus differentiation of seedling explants (root, stem, leaf). Shoots were formed spontaneously by one-step regeneration from stem callus grown on solidified Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg L^{-1} 6-Benzyl adenine (BA) and 0.2 mg L^{-1} Naphthalene Acetic- Acid (NAA) and root callus grown on MS medium supplemented with (0.5, 1.5 and 2.0) mg L^{-1} Thidiazuron (TDZ).These shoots easily rooted on solidified free MSO medium and acclimatized successfully. Somatic embryos were induced from stem's and root's callus, as well as from stem and root explants when cultured and maintained on MS medium supplemented with (0.4 and 0.5) mg L^{-1} TDZ. By culturing the excised embryos on solidified MSO medium, 205 shoots were formed and rooted successfully. This was considered a suitable path for the production of large numbers of broccoli plants.

In one of its important aspects, the current study was able to produce synthetic seeds using somatic embryos and shoot tips. The results showed that the concentration of 2% sodium alginate was very suitable in giving highest conversion rate (germination) of seeds from somatic embryos, which reached 60% when stored for 7 days at 4°C, while 3% sodium alginate gave the highest conversion rate for seeds containing shoot tips (96%) under the same conditions (7 days storage period at 4°C). The concentration of 2% sodium alginate was adopted in the experiments to encapsulate the somatic embryos and the shoot tips, as it gave the best shape for the artificial seeds in the form of spherical structures (Beads) by interfering with 12/mg l-hydrated calcium chloride CaCl2. 2H2O used as a hardening agent for seeds.

It was clear, that increasing the storage period of these artificial seeds reflected negatively on the percentage of their conversion, which reached the lowest levels 28 and 52% when stored for 60 days at 4 °C for both somatic embryo seeds and shoot tops, respectively. On the other hand, the increase in the storage temperature had a significant negative effect on the rate of conversion (0%) when they were stored for 30 days at 25°C. In addition, providing artificial seed's matrix with 1.0 mg L^{-1} BA and 0.5 mg L^{-1} NAA raised the germination efficiency to 68% when stored for 7 days at 4°C and 40% at 25°C for the same period.

Interestingly, transgenic broccoli plants were achieved by the wild strain of *Agrobacterium rhizogenes* ATCC13332 and its pRi-DNA (Root inducing plasmid), utilizing direct injection and Co-cultivation techniques. Hairy roots emerged in inoculated and non-inoculated sites after 7 days of leaves injection with a percentage of 81.1% when using the bacterial suspension with a light density of OD = 1.6, while the results of co-cultivation the leaves with pRi-DNA showed an increase in the rate of hairy roots induction, which recorded 85%.

One of the important results achieved, is that during the maintenance of hairy roots for three months on MSO medium their diameters increased and they acquired a green color. Moreover, large masses of callus were initiated from these hairy roots in both MS and Woody Plant Medium (WP) supplemented with different concentrations of TDZ (0.3, 0.5, 0.8, 1.0) mg L^{-1}. Through continuing subculture in these media, shoots regenerated, which were rooted easily after 7-9 days in MSO medium, then successfully acclimatized in the mixture of soil and peat moss. The phenotypic evidence of broccoli plants, represented by their shortness, change in the shape and wrinkling of their leaves, indicated that these plants are genetically transformed. Molecular biology tests

University of Mosul

College of Education
for Pure Science

Regeneration of Broccoli Plant *Brassica oleracea* var. italica from It's Artifical Seeds, Callus and Trasformed Hairy Roots via *Agrobacteriaum rhizogenes* ATCC 13332 with Isolation of Protoplast from It's Tissues

Raghad Mohammed Abdulla Al-Mula

Ph.D. Thesis
Biology

Supervised by

Assist. Prof.
Dr. Shifaa Mahdi Salih

Assist. Prof.
Dr. Qutaiba Shoaib Al-Neama

2022 A.D **1443 A.H**