جامعة الموصل
كلية العلوم

استقطاب دقائق اوكسيد النحاس النانوية بواسطة انسجة نباتات زهرة الشمس المحولة وراثياً بالناقل *A.rhizogenes* ATCC 15834

اشرف محمد حامد سالم السنجري

رسالة ماجستير
علوم الحياة / علم النبات

بإشراف
الأستاذ
الدكتور أمجد عبد الهادي محمد

١٤٤4هـ ٢٠٢٢ م

استقطاب دقائق اوكسيد النحاس النانوية بواسطة انسجة نباتات زهرة الشمس المحولة وراثياً بالناقل

الخلاصة

تحرت الدراسة الحالية دور تراكيز مختلفة من الدقائق النانوية لأوكسيد النحاس Cu_2O NPs (٠, ٣٠, ٦٠, ٩٠, ١٥٠) مايكروغرام مل$^{-1}$ في انبات بذور نبات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. ونمو بادراتها, واستحداث كالس قطع سيقانها تحت الفلقية ونموه, وتطرقت ايضا الى التحول الوراثي للنبات ببلازميدات Root inducing plasmids(pRi) المعزولة من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 وتأثرها بتلك الدقائق, ثم كشف قدرة الانسجة المختلفة على استقطاب Cu_2O NPs من خلال فحوصات المجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscope (SEM).

واظهرت النتائج تفوق التركيز ٣٠ مايكروغرام مل$^{-1}$ من الدقائق النانوية لأوكسيد النحاس عند اضافته الى وسط Murashig and Skoog (MS) الصلب في تحفيزه اعلى نسبة لإنبات البذور بلغت ١٠٠٪ بعد ٤ ايام مقارنة مع وسط MS وحده اذ بلغت نسبة الانبات ٨٠٪ بعد ٧ ايام. كما اظهرت دورها المميز في تمايز قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات زهرة الشمس, وتفوق ذات التركيز ٣٠ مايكروغرام مل$^{-1}$ في الوسط الغذائي في تشجيعه التمايز على المعاملات الاخرى, وكان للدقائق النانوية لأوكسيد النحاس دور مهم في استحداث كالس السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات زهرة الشمس المزروعة على اوساط MS الصلبة المدعمة بإضافة ٠.٥ ملغم لتر$^{-1}$ Naphthalin acetic acid (NAA) و ١.٠ ملغم لتر$^{-1}$ Benzyl adinen (BA) وتفوق التركيز ١٥٠ مايكروغرام مل$^{-1}$ عند اضافته في تحفيزه لاستحداث الكالس ونموه على التراكيز الاخرى, اذ بدأ الكالس بالاستحداث بعد ٧ ايام وبلغ معدل الوزن الطري للكالس النامي عليه ١١.٥ غم بعد ٤٠ يوماً من النمو. وبصورة مماثلة كان للدقائق النانوية دور في زيادة نمو الكالس, و كان للتركيز 150 مايكروغرام مل$^{-1}$ ذاته تفوق في تشجيع زيادة الوزن الطري للكالس النامي على اوساط MS مدعمة بمنظمات النمو NAA و BA بمعدل وزن طري بلغ ١٢.٩ غم بعد مرور 40 يوما من النمو. مقارنة مع معدله النامي على الوسط ذاته من دون الدقائق النانوية اذ بلغ معدله ٦.٢ غم بعد مرور ٤٠ يوماً.

ونجحت هذه الدراسة في احداث التحول الوراثي لنبات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. بواسطة الحقن المباشر ببلازميدات Ri المعزولة من السلالة ATCC 15834 لبكتريا *A .rhizogenes* وتكوين الجذور الشعرية, وتفوقت بلازميدات Ri ذات التركيز ١٥٢.٢٤ نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ في استحداث الجذور الشعرية بنسبة وصلت الى ٨١.٦٪ بعد ٥ ايام من التلقيح على التراكيز ١٤٨.٢٠ نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ و ١٢٦.١٨ نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ فقد بلغت نسبتهما ٣٣.٣٪ بعد ٦ ايام و ٢٨.٣٪ بعد ٧ ايام على التوالي. وتمكنت هذه الجذور من تكوين مزارع الجذور الشعرية عند استئصالها وزراعتها على اطباق بتري حاوية على وسط MS الصلب. كما نجحت هذه الجذور الشعرية في تكوين الكالس عند زراعة خصلها على وسط MS الصلب والمجهز بمنظمات النمو ٠.٥ ملغم لتر$^{-1}$ NAA

و ١.٠ ملغم لتر$^{-١}$ BA. وبرهنت النتائج احداث التحول الوراثي على المستوى الجزيئي الناتج عن عزل الحامض النووي الكروموسومي Deoxyribonucleic acid (DNA) من أنواع الجذور الشعرية ومن عينة جذور البادرات (المقارنة), وابدى تفوق تركيزه المعزول من عينات الجذور الشعرية عن عينة المقارنة ونقاوته وعند تضخيمه باستخدام تقنية تفاعل التسلسلي البوليمرازي Polymerase chain reaction(PCR), وترحيله كهربائيا على الهلامة ١٪ ظهرت حزمة واحدة ذات حجم جزيئي ٢٤٨ زوج قاعدة base pair (bp) مماثلة للحجم الجزيئي للبادئ المتخصص للجين *rol* A من عينات الحامض المضخم والمعزول من الجذور الشعرية, مع غياب هذه الحزمة من الحامض النووي DNA المعزول من الجذور الاعتيادية وهذه تعد دلالة واضحة على نجاح التحول الوراثي لتلك الانسجة.

وكان للدقائق النانوية لأوكسيد النحاس ١٥٠ مايكروغرام مل$^{-١}$ فقط دور واضح في نمو الجذور الشعرية لنبات زهرة الشمس المحولة وراثيا ببلازميدات Ri ذات التركيز ١٥٢.٢٤ نانوغرام مايكروليتر$^{-١}$ المعزولة من بكتريا *A .rhizogenes* ATCC 15834, في حين كان لباقي التراكيز دور سلبي في تحفيز نموها وزيادة تفرعاتها. ولم تظهر الدقائق النانوية لأوكسيد النحاس دورا في تحفيز نمو الكالس المستحدث من الجذور الشعرية بل كان لها دور تثبيطي في نمو الكالس. في حين كان للدقائق النانوية لأوكسيد النحاس دور ايجابي في زيادة الوزن الطري للكالس المستحدث من الجذور الشعرية المتكونة بفعل تلقيحها ببلازميدات Ri ذات التركيز ١٥٢.٢٤ نانوغرام مايكروليتر والنامية على اوساط MS الصلبة المدعمة بإضافة ٠.٥ ملغم لتر$^{-١}$ NAA و ١.٠ ملغم لتر$^{-١}$ BA, وتفوق الكالس النامي على وسط MS الحاوي على التركيز ١٥٠ مايكروغرام مل$^{-١}$ على التراكيز الاخرى, بمعدل وزن طري ١٩.٤ غم بعد ٤٠ يوماً من النمو مقارنة مع وسط MS الصلب (المقارنة) الخالي من الدقائق النانوية اذ بلغ معدل الوزن الطري للكالس النامي عليه ٢.٩ غم.

واعطت الدراسة الحالية مؤشرات مميزة على قدرة انسجة مختلفة من نبات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. في استقطاب الدقائق النانوية لأوكسيد النحاس Cu_2O على اسطح خلاياها والتي تعكس دورها المهم في المعالجة النباتية، واظهرت صور المجهر الالكتروني الماسح قدرة انسجة الكالس على استقطاب الدقائق النانوية على سطوح خلاياها وبكميات متباينة حسب تباين التراكيز المستخدمة وحسب نوع النسيج, فقد اظهرت البادرات المعاملة بالدقائق النانوية تفوق خلايا البادرات النامية على وسط MS الحاوي على التركيز ٣٠ مايكروغرام مل$^{-١}$ في استقطاب الدقائق النانوية على اسطح خلاياها على باقي التركيز, بينما خلت خلايا البادرات النامية على وسط MS لوحده (المقارنة) من هذه الدقائق النانوية. بينما اكدت نتائج الانسجة الاخرى المعاملة بالدقائق النانوية تفوق الانسجة المختلفة النامية على وسط MS الصلب والحاوي على التركيز ١٥٠ مايكروغرام مل$^{-١}$ على باقي التراكيز في قدرتها على استقطاب هذه الدقائق النانوية على اسطح خلاياها, بينما خلت عينات المقارنة في جميع الانسجة من هذه الدقائق النانوية.

Abstract

The current study investigated the role of different concentrations of cupper oxide nanoparticles Cu_2ONPs (0,30,60,90,150) μg ml^{-1} in the germination the seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant, seedlings growth, hypocotyle callus initiation and growth, It also dealt with the success of the genetic transformation of plants with root inducing plasmids (pRi) isolated from *A. rhizogenes* ATCC 15834 and its influence by those nanoparticles, and then revealing the ability of different tissues to uptake Cu_2ONPs through scanning electron microscope (SEM) examinations.

The results showed that 30 μg ml^{-1} of cupper oxide nanoparticles when added to solid Murashig and Skoog (MS) solid medium was superior in stimulating the highest percentage of seed germination reached 100% after 4 days, compared with MS medium alone, the germination rate was 80% after 7 days. It also showed its distinguished role in the differentiation of seedlings stems of sunflower, and the concentration of 30 μg ml^{-1} in the nutrient medium was superior in encouraged differentiation over other treatments. Cupper oxide nanoparticles had important role in the development of callus from seedlings stems of sunflower plant which grown on MS solid media supplemented with 0.5 mg L^{-1} NAA and 1.0 mg L^{-1} BA. The concentration 150 μg ml^{-1} stimulated high callus initiation , as the callus began to formed after 7 days its average fresh weight reached 11.5 g after 40 days of growth. Similarly, nanoparticles had a role in increasing the callus growth, and the same concentration of 150 μg ml^{-1} was superior in promoting the fresh weight of the developing callus on MS media supplemented with NAA and BA with an average fresh weight of 12.9 g after 40 days of growth.

This study succeeded in the genetic transformation of sunflower(*Helianthus annuus*. L) plant by direct injection of Ri plasmids isolated from *A. rhizogenes* ATCC 15834 and the formation of hairy roots, Ri plasmids with a concentration of 152.24 ng $μl^{-1}$ were superior in the development of hairy roots

with percentage reached to 81.6% after 5 days of inoculation over concentrations of 148.20 ng μl^{-1} and 126.18 ng μl^{-1}, which were 33.3% and 28.3% after 7 days respectively. These roots were able to form cultures. Also, these hairy roots able to intiate the callus when their grown on solid MS medium supplemented with 0.5 mg L^{-1} NAA and 1.0 mg L^{-1} BA.

The current study improved the genetic transformation at the molecular level resulting from the isolation of the chromosomal Deoxyribonucleic acid (DNA) from hairy roots and from the seedling roots sample (control), It showed that its concentration in hairy roots samples was superior to the control sample and its purity, and when it was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) technique, and electrophoresed on a 1% agarose gel, one band appeared with a molecular size of 248 base pair (bp) similar to the molecular size of the Specific primer of the *rol A* gene for the amplified samples isolated from hairy roots, with the absence of this band of DNA isolated from normal root and these improve the success of genetic transformation of these tissues.

Only 150 µg ml^{-1} cupper oxide nanoparticles had a obevious role in the growth of transgenic hairy roots of sunflower plants with 152.24 ng μl^{-1} of Ri plasmids. The cupper oxide nanoparticles did not show a role in stimulating the growth of the callus induced by the hairy roots, but rather it had an inhibitory role on the growth of the callus, as the callus did not develop in size and led to its yellowing and then death after 20 days. Whereas, had a positive role in increasing the fresh weight of the callus induced from hairy roots formed by inoculating them with Ri plasmids with a concentration of 152.24 ng μl^{-1} grown on MS solid media supplemented with 0.5 mg L^{-1} NAA and 1.0 mg L^{-1} BA, especially when supplemented with 150 µg ml^{-1} was superior to the other concentrations, in average fresh weight that reached 19.4 g after 40 days of growth.

The current study gave distinct indications of the ability of different tissues of the sunflower plant *Helianthus annuus* L. to uptake Cu_2O nanoparticles on the

surfaces of their cells, which reflects its important role in phytoremediation, The scanning electron microscope images showed the ability of the callus tissue to uptake the nanoparticles on the surfaces of its cells and in varying quantities according to the variation of the concentrations used and the type of tissue, The seedlings treated with nanoparticles showed their superiority to grow on MS medium containing a concentration of 30 µg ml^{-1}. While the results of other tissues treated with nanoparticles confirmed the superiority of different tissues grown on solid MS medium containing a concentration of 150 µg ml^{-1} over the rest of the concentrations in their ability to uptake these nanoparticles on the surfaces of their cells.

University of Mosul

College of Science

Uptake of cupper oxid nanoparticles by *Helianthus annuus* transformed tissues via *A.rhizogenes* ATCC 15834

Ashraf Mohammed Hamed Salem Al-Sinjiri

M.Sc. Thesis

In

Biology / Botany

Supervised By

Professor

Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed

1444 A.H. **2022 A.D.**