جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

مقارنة مظهرية وتشريحية بين نباتات البطيخ المحولة وراثياً ببكتريا *Agrobacterium tumefaciens* و الاعتيادية مع تقدير المواد الفينولية

احمد محمود محمد الطائي

رسالة ماجستير

علوم الحياة /علم النبات

بإشراف

الاستاذ المساعد

الدكتورة سهلة محمد زيدان

1440هـ 2018م

الخلاصة

تمكنت هذه الدراسة من استحداث العُقَد أو الأورام التاجية على سيقان بادرات البطيخ *Cucumis melo L.* بالحقن المباشر للمعلق البكتيري لبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجي Crown Gall على نباتات الآس *Myrtus communis* , وتكونت الأورام بعد مرور 20–25 يوماً من التلقيح وبينت نتائج الدراسة أيضاً استجابة سيقان نباتات البطيخ *C.melo* للتلقيح بالمعلق البكتيري لهذه البكتيريا وتميزت النباتات الملقحة بقصرها وتجعد أوراقها وقلة عدد الافرع الخضرية المحمولة على السيقان وصغر المساحة الورقية مع زيادة في كثافة الجذور مقارنة بالنباتات الغير الملقحة , في حين لم تبدِ الأوراق الملقحة في العرق الوسطي أي استجابة للحقن وظهرت عليها علامات الذبول والاصفرار والتيبس بعد 6 اسابيع من الإصابة بالبكتريا وتبين من الدراسة الفسلجية لنباتات البطيخ الملقحة حدوث انخفاض في محتوى الرطوبة النسبي إلى 10.5% في حين كانت 25.5% في نباتات المقارنة , ادى ذلك الى انخفاض في محتوى البروتين في اجزاء نباتات البطيخ الملقحة , وفي نفس الوقت حصلت زيادة في محتوى الكلوروفيل في أوراق النباتات الملقحة إلى أعلى مستوى له 2.6 mg/g بعمر 8 اسابيع من التلقيح أو الاصابة .

أعطت نتائج التقدير الكمي والنوعي للمركبات الفينولية من مستخلصات (الجذور – السيقان – الاوراق) لنباتات البطيخ الملقحة بالبكتريا بعمر 4 اسابيع بتقانة الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography(TLC) إلى وجود زيادة واضحة في محتوى المركبات الفينولية في ألاوراق والسيقان وحصل انخفاض ضئيل في محتواها في الجذور مقارنة بالنباتات الاعتيادية وحددت مسافة الجريان Rate of flow (Rf) للبقع المفصولة في عينات المركبات وكانت مطابقة لقيم Rf في العينات القياسية الواردة في المصادر , وإنَّ اغلب المركبات الفينولية المتواجدة في المستخلصات النباتية المستخدمة تنتمي إلى مجموعة Hydroxycinnamic acids والتي تشمل (Isoferulic , 3,4,5 Trimethoxycinnamic , P-Coumaric , O-Cinnamic Methoxycinnamic,) فضلاً عن بعض الاحماض الفينولية مثل Gallic acid ,وإنَّ تشابه قيم Rf للبقع المفصولة للعينات التجريبية مع قيم Rf القياسية للمركبات يدل على تشابه تركيبها الكيميائي .

اظهرت فحوصات المجهر الضوئي للقطاعات العرضية والطولية لأجزاء نباتات البطيخ (الجذر, الساق والورقة) الملقحة ببكتريا *A.tumefaciens* بمقارنتها بمثيلاتها النباتات الاعتيادية عن اختلافات تشريحية ونسيجية في تركيب وتوزيع الأنسجة الإبتدائية للأنظمة النسيجية الثلاثة (الضام , الوعائي والاساسي) واختلاف في عدد الحزم الوعائية ذات الجانبين واحجامها وبينت

المقاطع العرضية للسيقان وجود 10 حزم وعائية في النباتات الملقحة مقابل 8 حزم في عينات المقارنة , واضافة الى انتشار اعداد كبيرة من العناصر الناقلة المتمثلة بالأوعية الخشبية وبلغت ابعادها(2.8 × 2.4) مايكروميتر في السيقان وكانت معظم التغلظات من النوع النقري والشبكي والسلمي على جدرانها الثانوية , فضلاً عن اقترانها بالأنابيب المنخلية والصفائح المنخلية والتي بلغت اعدادها (15) انبوباً في المليميتر المربع الواحد وبأبعاد(0.4×2.4) مايكروميتر, وتميزت بوجود المواد الهلامية المنتشرة على الجدران النهائية وارتبطت بالانسجة الناقلة 5–6 طبقات من خلايا الكامبيوم الوعائي وحصل التباين في تركيب خلايا القشرة حيثُ كانت معظمها من النوع الكولنكيمي الزاوي وعدد طبقاتها من 6–7 في النباتات الملقحة وتبادلت الخلايا البرانكيمية مع الخلايا الكولنكيمية في قشرة النباتات الغير الملقحة ,وبينما كانت أعداد الاوعية الخشبية (14) وعاءاً وبابعاد (1.2×1.1) في جذور نباتات البطيخ الملقحة , حصل تباين ايضاً في اعداد الثغور المنتشرة في بشرة الاوراق والسيقان وكانت طرز الثغور من النوع الشاذ Anomocytic type وكان دليل الثغور فيها 18%.

أظهرت فحوصات المجهر الضوئي للمقاطع العرضية لجذور نباتات البطيخ الملقحة زيادة في كثافة الجذور واتساع منطقة القشرة وبدا واضحاً فيها اشرطة كاسبر في الجدران القطرية للخلايا وبينت نتائج التشريح الداخلي للأوراق كبر حجم الحزمة الوعائية في العرق الوسطي واحتوائها اعداداً كبيرة من الاوعية والقصيبات الخشبية المرتبة في 9 صفوف قطرية كل صف يحتوي على 5 اوعية خشبية وتربط 13 عنصراً من عناصر اللحاء التالي في الحزمة الواحدة , وتوزعت الشعيرات البشرية على أسطح الأوراق وكانت من النوع المتعدد الخلايا المدبب النهايات وقاعدة مؤلفة من 8 خلايا , وأشارت الفحوصات المجهرية للخشب المفكك في السيقان احتوائها على الأوعية , القصيبات , الألياف والبارنكيميا وكان هناك اختلافات واضحة في المعالم للعناصر الناقلة وتثخناتها وتباينت في ابعادها وكانت 11.0 × 0.9 مايكروميتر في النباتات الملقحة ووصلت الى 5.8×0.9 مايكروميتر في النباتات المقارنة .

إنَّ ظهور بعض التغايرات المظهرية والتشريحية على نباتات البطيخ الملقحة ببكتريا *A.tumefaciens* يؤكد مسؤولية الجينات المحمولة على قطعة T-DNA المتوقع انتقالها إلى النباتات .

Abstract

This study was able to produce tumors or Crown gall on stems of *Cucumis melo* Seedlings by direct injection of the bacterial suspension of the *Agrobacterium tumefaciens* bacteria caused by Crown gall on *Myrtus communis*. The tumors were formed after 20-25 days of vaccination. The injected plants were characterized by their shortness and wrinkling of leaves, The small number of vegetative branches on the stems and the small paper area with an increase in root density compared to the normal plants. But the leaves injected in midrib not showing any response and after weeks they're showed signs of Wolves, yellow berries and pepsin. The physiological study of inoculated plants showed a decrease in relative water content to 10.5% while 25.5% in comparison plants. This was reflected in the protein content of the studied plant parts. At the same time, Chlorophyll content in inoculated plant leaves to the highest level of 2.6 mg /g at 8 weeks of infection.

The results of the determinative of the quantitative and qualitative of phenolic compounds from the extracts (Roots, Stems, Leaves) of melon plants inoculated with 4-week-old Thin Layer Chromatography (TLC) showed a marked increase in the phenolic compounds in leaves and stems and decreased their roots content compared to Normal plants. The rate of flow (Rf) of specimens separated in compounds samples and conforming to Rf values in standard samples and relying on sources for non-availability. Most of the phenolic compounds present in the plant extracts used to belong to the hydroxycinnamic acids group Include (O-Cinnamic, P-Coumaric, 3,4,5 Trimethoxycinnamic, Isoferulic, Methoxycinnamic) as well as some phenolic acids, such as Gallic acid, and the similarity of Rf values Verily patches separated the experimental samples with standard values of Rf compounds show the similarity of their chemical composition.

The anatomical and longitudinal analysis of the parts of melon plants (Roots, Stems and Leaves) inoculated with *A. tumefaciens* compared with Normal plants showed anatomical and histological differences in the composition and distribution of primary tissues of the three histological systems (Dermal, Vascular, and Ground) and differences in the number of vascular bundles And the size of the cross sections of the stems and the existence of 10 vascular bundles in the inoculated plants compared to 8 bundles in comparison samples, In addition to the proliferation of large numbers of transport elements of wood vessels and dimensions (2.8 × 2.4) Most of the thickness were Pitted, Reticulate and Scalariform on their secondary walls, as well as by means of sieve tubes and sieve plates, which reached 15 tubes per square millimeter (0.4 × 2.4) micrometers. They were

characterized by the presence of Slime Plug on the final walls, 5-6 layers of the Cambium vascular cells and obtained variation in the composition of the cells of the, Where most of the type of angular collenchyma and the number of layers of 6-7 in the inoculated plants and exchanged with the parenchyma cells in the cortex of injected plants, and while The number of wooden vessels (14) was a pot and dimensions (1.2 × 1.1) in the roots of the melted watermelon plants. There was also a difference in the number of stomata on the surface of leaves and stems. The stomata type was Anomocytic a type and the stomata index was 18% in inoculated plants.

The examination of roots sections of the inoculated plants showed increase density of roots and enlargement in cortex area.Also the results of the internal anatomy of leaves showed the size of vascular bundles in midrib also showed numbers of vessels and tracheids xylem arrangement in 9 rows every row content 5 vessels bonded with 13elemnets of Meta phloem in one bundle . The epidermal hairs were distributed on the surface of the leaves and were of the multicellular type endothelium and the 8-cell base. The microscopic examination of the macerated wood in the stems indicated that the vessels, tracheids, fibers and parenchyma cells were distinct differences in the parameters of the vector elements and their thickness were varied in their dimensions and were 11.0 × 0.9 Micrometer in inoculated plants and reached 5.8 x 0.9 µm in normal plants.

The appearance of some phenotypic and anatomical variations on the melon plants inoculation with *A. tumefaciens* confirms the responsibility of the genes that are carried on the T-DNA that have been transferred to the plants.

University of Mosul
College of Education
of Pure Sciences

A Comparative Morphological and Anatomical of Genetically Transformed *Cucumis melo L.* plants by *Agrobacterium tumefaciens* with Normal Plants and Determination of Phenolic Substances

Ahmed Mahmoud Mohammed Al-Taee

M.SC. Thesis

Biology / Botany

SUPERVISED BY

Assist. Prof.

Dr. Sahla Mohammad Zeadan

2018 A. D. **1440 A. H.**