



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

دور جسيمات أوكسيد الزنك النانوي والتحول الوراثي ببكتريا
Agrobacterium rhizogenes ATCC 13332

في تحسين انتاج المركبات الفينولية لنبات الكلغان
Silybum marianum L.

إسلام ياسر عبدالله طه الحمداني

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ

الدكتور مثنى جاسم محمد الطائي

الأستاذ

الدكتورة شفاء مهدي صالح الطائي

٢٠٢٥ م

١٤٤٧ هـ

الخلاصة

انتجت مزارع كالس نبات الكلغان *Silybum marianum* L. من اجزاء بادراته المختلفة بعمر 20 يوما" بوجود تراكيز متداخلة من (BA) Benzyl adenine و (NAA) Naphthalene acetic acid وت فوق وسط MS الصلب الحاوي على 0.5 ملغم.لتر⁻¹ من BA و 2.0 ملغم.لتر⁻¹ من NAA عن بقية التراكيز بنسب استحثاثه للكالس لجميع الأجزاء وامتاز الكالس بقوامه شبه الهش ولونه الأخضر المصفر.

حققت بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 13332 نجاحا في هذه الدراسة بدلالة الاستجابة التي أبدتها قطع الأوراق والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية لعملية الحقن المباشر بمعلقها وتكوين الجذور الشعرية من أماكن الحقن وتميزت الجذور الشعرية بكونها مفردة أحيانا أو تظهر بشكل خصل مكونة من أربعة إلى خمسة جذور متجمعة بيضاء اللون رقيقة وذات شعيرات ناعمة كما تميزت هذه الجذور بسلبيتها للجاذبية الأرضية واستمرار نموها قياسا للجذور الاعتيادية، تفوقت الأوراق على بقية الأجزاء في سرعة إستجابتها للحقن المباشر وأعطت جذورا شعرية بعد مرور ستة أيام من عملية حقنها كما أعطت أعلى نسبة مئوية لإنتاج الجذور الشعرية بلغت 55.86% بينما ظهرت الجذور الشعرية على أماكن الحقن في الأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية بعد 10 أيام من حقنها وزراعتها على وسط MSO الخالي من منظمات النمو بنسب مئوية بلغت 24.44 و 36.84% على التوالي. من النتائج المميزة ظهور نموات خضرية صغيرة بشكل مباشر من قطع الأوراق المحقونة بعد تحول جذورها الشعرية إلى كالس بعد أسبوع من عملية الإدامة الدورية على وسط MS المزود بـ 0.5 ملغم.لتر⁻¹ من NAA تطورت بعدها إلى أفرع خضرية حاملة لأوراق حقيقية في غضون شهر واحد من بدء زراعتها على وسط الإدامة ولم يتم التوصل إلى وسط ملائم لتجذير هذه الأفرع سواء على وسط MS بكامل قوته التركيبية أو نصفها.

تمكنت الدراسة من انتاج مزارع كالس الجذور الشعرية إذ تفوقت الجذور الشعرية الناتجة من الأوراق والأوراق الفلقية بنسبة 100% في إنتاج الكالس في ثلاثة أوساط غذائية متمثلة بوسط (MS+3.0mg.L⁻¹BA+0.5mg.L⁻¹NAA) و (MS+1.0 mg.L⁻¹ BA+0.1 mg.L⁻¹ IBA) و (WP+1.0mg.L⁻¹ NAA) واعتمد الوسط الأخير لإدامة مزارع كالس الجذور الشعرية نظرا" لتسجيله أعلى نسب استحثاث.

فضلا عن جميع الصفات المورفولوجية الدالة على نجاح عملية التحول الوراثي لنبات الكلغان في هذه الدراسة فقد جاءت اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction والترحيل الكهربائي للأحماض النووية المضخمة باستعمال بادئات متخصصة لجينات *rol B* المحمولة على قطعة T-DNA لبلازميد Ri لتؤكد هذا النجاح وتبرهن احتفاظ أنسجة نبات الكلغان سواء "الجذور الشعرية أو كالسها أو الأفرع الخضرية الناتجة بجينات *rol B* وتضمينها داخل جينوم خلاياها.

استخدمت جسيمات أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs بتركيز تراوحت بين (25-300) مايكروغرام. ملتر⁻¹ لتحفيز انتاج مزارع الكالس، وتمكن التركيز 300 مايكروغرام. ملتر⁻¹ من رفع نسبة استحثاث كالس الأوراق قياسا لعينات المقارنة وبفترة زمنية قياسية بلغت 5 أيام مقارنة بـ 12 يوما" على أوساط المقارنة، فضلا" عن بقية الأجزاء والتي كانت نسبة استحثاثها 100% أيضا" بالنسبة نفسها في عينات المقارنة لكن نمو الكالس كان أفضل إذ تميز باللون الأخضر البراق وقابليته السريعة للاستحثاث. من النتائج التي حققتها هذه الدراسة هي نجاح جسيمات أكسيد الزنك النانوي في رفع نسبة استحثاث الجذور الشعرية من قطع الأوراق المحقونة ببكتريا *A. rhizogenes* ATCC 13332 فقد أظهر التركيز 150 مايكروغرام. ملتر⁻¹ نسبة استحثاث بلغت 100% قياسا لعينات المقارنة البالغة نسبة استحثاث الجذور الشعرية فيها 55.86% وخلال فترة ثلاثة أيام فقط بينما في عينات المقارنة كانت مدة استحثاثها ستة أيام وبذلك يعدّ هذا التركيز هو الأفضل من بين بقية التراكيز، كما كان للتركيز 100 مايكروغرام. ملتر⁻¹ الدور الإيجابي أيضا في رفع نسبة الاستحثاث إلى 90.34% وبمدة زمنية قدرها أربعة أيام وبشكل عام لوحظ أن التراكيز المرتفعة وخاصة التركيز 300 مايكروغرام. ملتر⁻¹ ولكل العينات المدروسة سواء في الأوراق أو الأوراق الفلقية أو السيقان تحت الفلقية المحقونة بالبكتريا كان مثبطا" لاستحثاث الجذور الشعرية فيها قياسا" لعينات المقارنة أو بقية التراكيز، كما لم تظهر أي استجابة للأوراق الفلقية عند التراكيز 150 و 200 و 300 مايكروغرام. ملتر⁻¹.

أثبت تركيز 100 مايكروغرام. ملتر⁻¹ من ZnO-NPs تفوقه على بقية التراكيز في تحفيزه استحداث كالس الجذور الشعرية لنبات الكلغان بنسبة 100% للأوراق والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية وتبين من خلال النتائج أنه كلما كانت التراكيز قليلة كانت الاستجابة أفضل وصولا لأعلى تركيز والبالغ 200 مايكروغرام. ملتر⁻¹ بدأت استجابة خصل الجذور الشعرية لإنتاج كالسها تقل عن بقية التراكيز. شخصت العديد من المركبات الفعالة في المستخلصات المختلفة لأجزاء نبات الكلغان ومزارع الكالس الناشئة منها وقد تابنت المركبات بأنواعها وتراكيزها فيما بينها باستخدام تقنية GC-MS كما تم تشخيص العديد من المركبات في مستخلصات مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثيا للأوراق والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية وكالسها،

و ظهرت العديد من المركبات الفعالة في مستخلصات كالس الأوراق والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية والجذور والنامية على وسط MS المنتخب المزود بالتركيز 150 مايكروغرام. ملتر⁻¹ من ZnO-NPs ، ولوحظ التأثير الايجابي لكل من عملية التحول الوراثي باستخدام بكتريا *A. rhizogenese* ATCC 13332 وجسيمات أوكسيد الزنك النانوي في تعزيز محتوى الكثير من المركبات ونتاج مركبات جديدة. كما تم تشخيص 12 مركبا " فينوليا" مختلفا" في مستخلصات أجزاء نبات الكلغان المختلفة ومزارع الكالس الناشئة منها باستخدام تقنية HPLC وهي (Rutin ، Quercetin ، Kaempferol ، Ferulic acid ، Chlorogenic ، P-coumaric acid ، Luteolin Gallic acid ، Apigenin ، Caffeic acid Sinapic acid ، Syringeic acid ، acid)، وتمكنت الدراسة من تشخيص مركب Silymarin المعروف بفعاليته العالية لعلاج أمراض الكبد بكل أنواعها في مستخلصات مزارع الجذور الشعرية والكالس الناشئ منها، وقد تميزت الأنسجة الناتجة من عملية التحول الوراثي والنامية تحت تأثير جسيمات ZnO-NPs بزيادة تركيز المحتوي الفينولي في مستخلصاتها.

برهنت الدراسة الحالية الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات الفعالة المشخصة في مستخلصات الأنسجة المختلفة للنبات ،وبشكل عام تفوقت جميع المستخلصات على قيم حامض الأسكوربيك القياسية عند التراكيز الأعلى من 30 جزءا في المليون وهذا يؤكد الفعالية العالية لنبات *S.marianum* L. كمضاد أكسدة قوي وفعال

وفعال	ضد	تراكم	الجذور	الحرية.
-------	----	-------	--------	---------

Abstract

Callus cultures of *Silybum marianum* L. have been produced from their different parts using sterilized and healthy seedlings 20-day age. Overlapping concentrations of benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (NAA) have already been used. MS medium containing 0.5 mg.L^{-1} of BA and 2.0 mg.L^{-1} of NAA is selected in this study as it outperforms the other concentrations in its callus induction rates for all parts. Callus has been characterized by its semi-brittle texture and green color, ranging from white to yellowish or brown.

The bacterium *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 13332 achieved success in this study, as indicated by the response shown by the leaves explants, cotyledonary leaves and hypocotyls to the direct injection process with its suspension, and the formation of hairy roots from the injection sites. Hairy roots are characterized by being sometimes single or appearing in the form of tufts consisting of four to five white, clustered roots, it is thin and has soft hair. These roots are characterized by their negativity to gravity and their continued growth compared to the normal roots. The leaves outperform the rest of the parts in their rapid response to direct injection and produced hairy roots six days after the injection process. They also produce the highest percentage of hairy roots production, reaching 55.86%, while hairy roots appear at the injection sites in the cotyledonary leaves and hypocotyls 10 days after their injection and cultivation on MSO medium free of growth regulators, with percentages reaching 24.44 and 36.84%, respectively. One of the distinctive results is the appearance of small green growths directly from the injected leaves explants after their hairy roots have turned into callus after a week of periodic maintenance on MS medium supplemented with 0.5 mg L^{-1} of NAA. These develop later into green branches bearing true leaves within one month of starting to grow them on the maintenance medium. No suitable medium is found for rootising these branches, whether on MS medium at full or half its structural strength.

The study proves the ability of producing hairy roots callus cultures, as the hairy roots are produced from leaves and cotyledonary leaves outperformed by 100% in callus production in three nutritional media represented by the medium (MS + 1.0 mg.L^{-1} BA + 0.1 mg.L^{-1} IBA), (MS + 3.0 mg.L^{-1} BA + 0.5 mg.L^{-1} NAA), and (WP + 1.0 mg.L^{-1} NAA). The last medium has been used to maintain the hairy roots callus cultures due to its recording the highest induction rates.

In addition to all the morphological characteristics indicating the success of the genetic transformation process of *Silybum marianum* L. in this study, the Polymerase Chain Reaction (PCR) tests and electrophoresis of amplified nucleic acids results. By using specialized primers for the *rol B* genes carried on the T-DNA fragment of the Ri plasmid, it is worth confirming this success, and demonstrate that the tissues of *Silybum marianum* L., whether hairy roots, callus, or the resulting shoots, retain the *rol B* genes and include them within the genome of their cells.

Zinc oxide nanoparticles at concentrations from (25 – 300) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were used to stimulate callus production. The concentration of 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ is able to increase the percentage of leaves callus induction compared to the control samples, and in a record time period of 5 days, compared to 12 days on the control media . In addition to the rest of the parts, the induction rate is 100%, also at the same rate in the control samples, but the growth of callus is better, as it has been distinguished by its bright green color and its rapid ability to be induced. Among the results realized by this study is the success of zinc oxide nanoparticles in increasing the rate of hairy roots induction from leaves explants injected with *A. rhizogenes* ATCC 13332. The concentration of 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ shows an induction rate of 100% compared to the control samples, which have a hairy roots induction rate of 55.86% This occurs over a period of only three days, while the control samples has a six-day induction period. This concentration is therefore considered as the best among the other concentrations. The 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ concentration also plays a positive role in raising the induction rate to 90.34% Over a period of four days, it is generally observed that high concentrations, especially the concentration of 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, for all samples studied, whether in leaves, cotyledonary leaves, or hypocotyls injected with bacteria, are inhibitory to the induction of hairy roots compared to the control samples or the remaining concentrations. No response is shown in cotyledonary leaves at concentrations of 150, 200, and 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A concentration of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of ZnO-NPs proves to be superior to other concentrations in stimulating the formation of hairy roots callus in *Silybum marianum* L. by 100% for leaves, cotyledonary leaves, and hypocotyls. The results show that the lower concentrations were the better in response, reaching the highest concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, where the response of hairy roots tufts to callus production begin to decrease compared to other concentrations. Many active compounds have been identified in the various extracts of *Silybum marianum* L. parts and the callus cultures emerging from them. The types and concentrations of the compounds varied among them using the GC-MS technique. Many compounds have also been identified in the extracts of the genetically transformed hairy roots cultures of the leaves, cotyledonary leaves, hypocotyls, and callus cultures . And , many active compounds also appear in the extracts of callus of leaves, cotyledonary leaves, hypocotyls, and roots growing on the selected MS medium supplied with a concentration of 150 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ of ZnO-NPs, and the positive effect of both the genetic transformation process using *A. rhizogenese* ATCC 13332 and zinc oxide nanoparticles in enhancing the content of many compounds and producing new compounds was observed. Twelve different phenolic compounds have been identified in extracts of different parts of *Silybum marianum* L. and callus cultures emerging from them using the HPLC technique, namely: (Rutin, Quercetin, Kaempferol, Ferulic acid, Caffeic acid, Apigenin, Gallic acid, Luteolin, P-coumaric acid, Chlorogenic acid, Syringic acid, Sinapic acid). In the present study it is possible to identify the Silymarin compound, known for its high effectiveness in treating all types of liver diseases, in extracts of hairy roots cultures and the callus emerging from them. The tissues resulting from the genetic

transformation process and growing under the influence of ZnO-NPs are characterized by an increased concentration of phenolic content in their extracts.

Finally, the present study demonstrates the antioxidant activity of the identified active compounds in extracts of different tissues of the plant. In general, all extracts outperform the standard ascorbic acid values at concentrations above 30 ppm. This confirming the high effectiveness of *Silybum marianum* L. as a powerful antioxidant and effective against free radical accumulation.



**The Role of Zinc Oxide Nanoparticles and Genetic
Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC
13332 in Improving the Production of *Silybum
marianum* L. Phenolic Compounds**

Islam Yasir Abdullah Taha Al-Hamdany

Ph.D. thesis
Biology

Supervised by

Professor

Dr. Shifaa Mahdi Salih AL.Taee

Professor

Dr.Muthana Jasim AL.Taee

2025 A.D

1447 A.H