جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

مقارنةُ نباتاتِ اللوبيا *Vigna radiata* L. المتمايزةِ مِن كالسِ الجزءِ النباتيّ وكالسِ المُعلَّقاتِ الخلويَّةِ وقابليتُها في تكوينِ العُقَدِ المثبِّتةِ للنتروجين الجويّ والكشف عن الاحماض الامينية فيها

غنيَّة هيثم عبد الوهاب أَحمد القصاب

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإِشراف

الأُستاذ

الدكتورة جميلة هزَّاع رشيد

1444هـ

2023م

الملخص

تناولت الدراسة الحالية استحثاث الكالس من الأَوراق والسيقان تحت الفلقية Hypocotyl لنباتات اللوبيا.*Vigna radiata* L النامية على وسط Murashige and Skoog الحاوي على1.0 ملغرام/ لتر من a-Naphthalene acetic acid (NAA) و 0.5 ملغرام / لتر من Benzyl Adenine (BA) ولوحظ ان وسط استحثاث الكالس كان نفسه وسط التمايز وشجَّع تكوين الأَفرع الخضرية، ونجح تجذيرها في وسط Murashige and Skoog الخالي من منظمات النمو. وامكن إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات اللوبيا. *Vigna radiata* L، باستخدام وسطMurashige and Skoog المجهز بإضافة 1.0 ملغرام / لتر منNAA و0.5 ملغرام/ لتر من BA. نفذت زراعة كثافتين مختلفتين من المعلقات الخلوية باستخدام نوعين من الأَوساط الأَوَّل وسط MS0 خالٍ من منظمات النمو، والثاني وسط MS الحاوي على منظمات النمو1.0 ملغرام / لتر من NAA و0.5 ملغرام / لتر من BA. وأَظهرت البيانات ان كثافة الخلايا المزروعة في وسط MS المضاف إليه منظمات النمو أعلى من كثافة الخلايا النامية في وسط MS0 الخالي من منظمات النمو.

لُقحت جذور نباتات اللوبيا المزروعة في الحقل ونظيراتها المزروعة على وسط NF، وكذلك المشتقة من تمايز الكالس، والأُخرى المشتقة من تمايز كالس المعلقات الخلوية المزروعة على وسط NF الصلب ببكتيريا الرايزوبيوم *Cowpea Rhizobium* 321H لمدة 10-15 دقيقة وبعد 50 يوم من تلقيحها لوحظ تكوين العقد الجذرية على جذور نباتات اللوبيا الملقحة وغيابها في نباتات المقارنة (غير الملقحة).

استخدمت العقد الجذرية لقياس الأَحماض الأَمينيَّة كعلامة لنشاط العقيدات كبروتوكول بديل لمقايسة اختزال الأسيتيلينActylene Reduction Assay وكان اعلى تركيز للحامض الاميني اللايسين Lysine وادنى تركيز للحامض الاميني الاسبارتيك Aspartic في العقد الجذرية لنباتات اللوبيا النامية في الحقل، والعقد الجذرية النامية على وسط NF والعقد المشتقة من تمايز الكالس وتمايز كالس المعلقات الخلوية. وكذلك استخدمت العقد الجذرية في تحضير المقاطع التشريحية إذ أَظهرت نتائج فحوصات المجهر الضوئي للمقاطع العرضية للعقد الجذرية في جذور نباتات اللوبيا النامية في الحقل ونظيراتها الناتجة من الزراعة النسيجية الملقحة ببكتيريا الرايزوبيوم وجود انتفاخ في منطقة اختراق البكتيريا للشعيرات الجذرية، وأَكَّدت الفحوصات وجود البكتيريا وملاحظة أَشكالها المختلفة.

أَكَّدت نتائج قياس تراكيز البروتينات وجود فروقات واضحة في مستوى البروتينات في أَجزاء نباتات اللوبيا .L *V. radiata* المزروعة في الحقل بعمر 50 يوم ونباتات اللوبيا المزروعةعلى وسط NF الصلب بعمر 45-50 يوم وكالس نبات اللوبيا بعمر 25-30 يوم.

وتضمنت الدراسة اكتشاف صفات جديدة بتضخيم البادئات الخاصة بالجين 16S rRNA باستخدام تقانة تفاعل التضاعف المتسلسل PCR ووجود اختلاف بين فئات بكتيريا الرايزوبيوم *Cowpea Rhizobium* 321H عن طريق التحليل الوراثي الذي يبين العلاقة الوراثية لثلاثة عُزلات من بكتيريا الرايزوبيوم والمعزولة من العقد الجذرية لنباتات اللوبيا.

Abstract

The current study dealt with callus induction from leaves and hypocotyl explants of cowpea seedling *Vigna radiata* L. on Murashige & Skoog medium containing growth regulators 1.0 mgL^{-1} of a-Naphthalene acetic acid and 0.5mgL^{-1} of Benzyl Adenine. Cell suspension cultures were prepared from the hypocotyl callus of *Vigna radiata* L., using Murashige & Skoog medium provided with 1.0 mgL^{-1} of a-Naphthalene acetic acid and 0.5 mgL^{-1} of Benzyl Adenine.

Two different densities of cell suspension were cultured using two types of media. The first was MS0 medium free from of growth regulators, and the second was that MS medium density of containing 1.0 mgl^{-1} NAA and 0.5 mgl^{-1} BA. data showed the all cultured in MS medium supplemented with growth regulators was higher than density of cells growing in MS0 medium without growth regulators.

Roots system of cowpea plants cultivated in the field and cowpea plants derived from callus and those produced cell suspensions callus as well as cowpea plants grown in solid NF media were inoculated with *Cowpea Rhizobium* 321H for 10-15 minutes and after 50 days of inoculation, root nodules were developed on roots of inoculated cowpea plants.

Root nodules were used to measure amino acids as a marker of nodule activity as an alternative protocol to the Actylene Reduction Assay. The highest concentration of the amino acid lysine and the lowest concentration of aspartic amino acid were found in the root nodules of cowpea plants growing in the field, the root nodules growing on NF medium and the nodules derived from callus differentiation. and differentiation of callus cellular suspensions

Root nodules were also used in the preparation of anatomical sections, where the results of light microscopy examinations showed cross sections of root nodules in the roots of cowpea plants growing in the field and their counterparts resulting from tissue culture inoculated with rhizobium bacteria, and their presence. From swelling in the area of penetration of bacteria into the root hair. Examinations confirmed the presence of bacteria and noted their different shapes.

The results of measuring protein concentrations confirmed the presence of clear differences in the level of proteins in parts of white cowpea plant *Vigna radiata* L. grown in the field at the age of 50 days, cowpea plants growing on solid NF medium at the age of 50-45 days and callous cowpea plants at the age of 25-30 day.

The study included the discovery of new traits by amplifying the primers of the 16S rRNA gene using PCR technology and the existence of a difference between the classes of the bacterium *Cowpea Rhizobium* 321H by means of genetic analysis that shows the genetic relationship of three isolates of the rhizobium bacteria isolated from the root nodules of cowpea plants.

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Comparison of cowpea plants (*Vigna radiata* L.) differentiated from explants and cell suspension calli and their ability to produce atmospheric nitrogen fixing nodules and detection of amino acids in them

Ghanyah Haitham Abdel Wahab Ahmed Al-Qassab

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised By

Professor

Dr. Jamella Hazaa Rasheed

2023 A.D. **1444 A.H.**