جامعة الموصل

كلية العلوم

تحديد التعبير لجينات *hsp* و *mapk* في نباتات اللافندر المعرضة للصدمة الحرارية طويلة المدى والمحولة وراثياً ببلازميدات Ri لبكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

عزة عادل رشيد ناصر الطائي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم النبات

بإشراف

الأستاذ

الدكتور أمجد عبد الهادي محمد

٢٠٢٢ م ١٤٤٤هـ

الخلاصة

نجحت الدراسة الحالية في ايجاد افضل طريقة لإنبات بذور نبات اللافندر *Lavandula angustifolia* الساكنة والضعيفة ألانبات، اذ عوملت البذور بالتبريد والقشط والغمر في تراكيز (٠، ٠.١، 0.25، 0.5، ١.٠) غم لتر$^{-1}$ من محلول حامض الجبرليك Gibberellic acid (GA_3) لمدة ٢٤ ساعة. وتفوقت معاملة الغمر في محلول حامض الجبرليك بتركيز ٠.٥ غم لتر$^{-1}$ على باقي المعاملات إذ بلغت نسبة إنبات البذور فيها ٧٥٪ بعد ٦ أيام مقارنة بـ ٢٠٪ للبذور الغير معاملة (المقارنة) التي أنتجت بادرات ضعيفة النمو. وتمكنت الدراسة من استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية والأوراق لبادرات اللافندر على وسط موراشيج وسكوك Murashige and Skoog (MS) الصلب المدعم بإضافة ٣.٠ ملغم لتر$^{-1}$ نفثالين حامض الخليك Naphthalene acetic acid (NAA) و١٠ ملغم لتر$^{-1}$ بنزايل ادنين Benzyl adenine (BA) بعد ٧ أيام من الزراعة وتطورت لاحقاً الى مزارع عند إعادة زراعتها بعد ١٠ أيام. ومن النتائج التي تمَّ الحصول عليها في هذه الدراسة وبعد ١٢ يوماً من إعادة الزراعة ألاولى لعشرين قطعة من كالس السيقان تحت الفلقية على ذات الوسط قدرته للتكوين التلقائي للأفرع الخضرية بنسبة ١٠٠٪، والتي تمَّ تجذيرها بسهولة داخل وسط (MSO) الصلب بكامل قوته التركيبية الخالي من منظمات النمو. ومن النتائج المميزة ظهور تراكيب صغيرة خضراء اللون بعد ٦ أيام من إعادة الزراعة الثانية لكالس ألاوراق والتي نتج عنها تراكيب جنينية عديدة تطورت إلى الطور الكروي ثمَّ تحولت إلى الطور القلبي وبعدها تطاولت لتُعطي الطور الطوربيدي ومنها انتهت بتكوين الفلق. جميعها كانت بلون أخضر وتميزت بكثرة أعدادها ألمتكونة وعند نقلها كاملة الى وسط MSO بشكل مفرد انتجت نباتات كاملة لكل منها. وأظهرت نتائج تقدير تركيز الحامض الرايبوزي منقوص الاوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) النوع البلازميدي(pRi) المعزول من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 والمحُضنة مُسبقاً بثلاث مُدد زمنية ٢٤، ٤٨، ٧٢ ساعة، إلى تفوق تركيزهُ المعزول من البكتريا ذات مدة التحضين ٤٨ ساعة والذي بلغ ٩٨٨.٢١ نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$على باقي ألانواع.

وبينت نتائج تلقيح المجموع الخضري لبادرات نبات اللافندر *Lavandula angustifolia* الكاملة بالتراكيز المختلفة من البلازميدات Root inducing plasmid (pRi) والمزروعة على وسط MS الصلب تباين إستجابتها من خلال ظهور الجذور الشعرية وملاحظة تميّز التركيز ٩٨٨.٢١ نانوغرام مايكروليتر $^{-1}$ في تحفيزه أعلى نسبة إذ بلغت ٨٠ % بعد ٦ أيام. وكذلك أبدى الحامض النووي الكروموسومي المعزول من جميع أنواع اللافندر نقاوته بظهور حزم DNA في طبقة هلام ألاكاروز ١٪ بعد ترحيلهُ كهربائياً من دون تقطيع ومن جهة أُخرى أظهرت نتائج فحص تعريض ألاشعة فوق البنفسجية لقطعة هلامة ألاكاروز ١٪ المُرحل عليها كهربائياً عينات الحامض النووي المضخم بتقانة التفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase Chain Reaction(PCR) والمعزول من عينات أنسجة بادرات اللافندر *Lavandula angustifolia* الملقحة ببلازميدات pRi بتراكيز مُختلفة إنفصال حزمة واحدة بوزن جزيئي٢٤٨ base pair (bp) وهو يماثل الوزن الجزيئي للبادئ المتخصص لجين *rol A* المستخدم وغياب إنفصال الحزمة من الحامض DNA المعزول من خلايا المجموع الخضري للبادرات ألاعتيادية (المقارنة)، وتفوّق المجموع الخُضري لنباتات اللافندر المحولة وراثياً ببلازميدات Ri والمعزولة من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 بتركيز ٩٨٨.٢١ نانوغرام مايكروليتر $^{-1}$ على باقي ألانواع في محتواها من الزيت، إذ بلغ ٣٩٪ وتليهِ النباتات المتكونة من ألاجنة الجسمية والنباتات المتمايزة من كالس السيقان تحت الفلقية إذ بلغت النسبة ٣٥٪،٣٠٪ على التوالي وكانت لأنسجة الكالس المستحدثة من الاوراق والسيقان تحت الفلقية قدرة على إنتاج الزيت إذ بلغ ٢٨٪،٢٠.١٪ على التوالي في حين بلغ في عينات المقارنة المشتقة من نبات اللافندر النامي في مزارع الشلالات والمجموع الخضري للبادرات النامية على وسط MS ١٨.٩٪،١٨٪ على التوالي. وأظهرت نتائج الكشف عن نشاط تعبير جينات بروتينات الحرارة Heat Shock Protein (HSP) و جينات بروتينات الجفاف Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) في نباتات اللافندر *L. angustifolia* المختلفة والمعرضة للصدمة الحرارية طويلة المدى بدرجة

حـرارة ٣٠ سـيليزية ولمـدة ٥ سـاعات بتقانـة التفاعـل البـوليميرازي المتسلسـل للنسـخة العكسـية Real time- polymerase chain reaction (RT-PCR) زيادة تعبيره الجيني الملحوظ في البادرات المحولة وراثياً عن عينات المقارنة التي لم تظهر أي تعبير جيني مع تفوق البادرات الملقحة ببلازميدات Ri ذات التركيز ٩٨٨.٢١ نانوغرام مايكروليتر $^{-1}$على باقي الانواع، هذه النتائج تثمن دور جينات T-DNA المنقولة الى جينوم نبات اللافندر في تعزيز تعبيرهُ الجيني لمقاومة الظروف اللأحيائية ومنح هذا النبات قدرة النمو والتكاثر وانتاجه للزيت الطبي ذي الاهمية البالغة بتلك الظروف القاسية.

Abstract

The current study succeeded in finding the best method for germination the lavender (*Lavandula angustifolia*) seeds which were dormant and weakly by germinated its treated with cooling, scratching and immersing in (0,0.1, 0.25, 0.5 and 1.0) g L^{-1} of Gibberellic acid (GA3) solution for 24 hour, the immersion of seeds in 0.5 g L^{-1} of Gibberellic acid GA_3 solution was highly efficient as compared to the other treatments, in stimulating the germination since the percentage was at 75% after 6 days only as compared to 20% for untreated seeds. The study was able to initiate callus from hypocotyls and leaves of lavender seedlings on solid Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3.0 mg L^{-1} Naphthalene acetic acid (NAA) and 10 mg L^{-1} Benzyl adenine (BA) after 7 days of culture. The results indicated that, after 12 days of the first sucultured with twenty pieces of hypocotyls callus on the same medium, it showed its ability to spontaneous production of shoot with apercentage of 100%, which were easily rooted in full strength solid MS medium free from growth regulators. One of the distinctive results is the appearance of small green structures after 6 days of the second subcultured of the leaves callus, which formed several embryonic structures that developed into the spherical stage then heart stage and then lengthened to give the torpedo stage and ended with the cotyledons stage. All of them were green and characterized by their large numbers. The transferring of cotyleduory stage to MSO medium, produced a complete plant. The results, of estimation concentration of (pRi) isolated from *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, which incubated with three periods of (24, 48 and 72 hours) showed the superiority of 24 hour, incubation period in producing 988.21 ng µl $^{-1}$ .Inoculated of the shoots of whole seedlings of *L. angustifolia* with different concentrations of plasmid (pRi) and cultured in MS solid medium showed the variation of their response through the appearance of hairy roots. The concentration of 988.21 ng µl $^{-1}$ was distinguished from the isolated plasmids with the highest hairy roots stimulating percent, which reached

80% after 6 days. The Chromosomal deoxy ribonucleic acid (DNA) isolated from all types of lavender tissues showed its purity by the appearance of bands in 1% agarose gel after being electrophoresed without cutting. On the other hand the figure of the electrophoresis of 1% agarose gel containing DNA isolated from different tissues of lavender which inoculated with different concentrations of plasmids and amplified by Polymerase chain reaction (PCR) technology appeared a single band separated with a molecular weight of 248 base pair (bp), which is similar to the molecular weight of the specific primer of the *rol* A gene used in this study, with absence of that band in DNA sample isolated from the shoots of normal seedlings (control), The shoots of lavender genetically transformed with Ri plasmids isolated from Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834 at a concentration of 988.21 ng μl^{-1} was superior in its oil content, as it reached 39% followed by plants rgenerated from somatic embryos and plants differentiated from the callus of the subcotyledonous stems, where the percentage reached 35%, 30%, respectively. The callus of leaves and hypocotyls had the ability to produce oil, which amounted to 28% and 20.1%, respectively, Whereas in the control samples reached lavender plant grown in Al- Shalalat region and seedlings growing on MS medium was 18.9%, 18%, respectively. The results of the detection of the expression activity of Heat Shock Protein (HSP) and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) genes in different lavender plants exposed to long-term heat shock at 30 C° for 5 hours using the Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Technique (RT-PCR) showed an increase in its gene expression in the transgenic seedlings compared to that of the control, which don't show any gene expression, with the superiority of the seedlings inoculated with 988.21 ng μl^{-1} of Ri plasmids. These results appreciate the role of the T-DNA genes transferred to the lavender plant genome in promoting gene expression to resist abiotic conditions and granting this plant the ability to grow and produce medicinal oil of great importance in these hard conditions.

University of Mosul

College of Science

Determination of gene expression for *hsp* and *mapk* in Lavender plants exposed to long term heat shock that were genetically modified by Ri plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

Azza Adel Rasheed Nasser Al-Tai

M.Sc. Thesis

Biology /Botany

Supervised By

Professor Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed

144٤ A.H. **2022 A.D**