



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

الانتقال الافقي للجينات لكل من بكتريا *A. tumefaciens* و
S. meliloti وثبات تعبير جينات T-DNA في نبات الجت
M.sativa

أطروحة مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة
الموصل وهي جزء من متطلبات درجة دكتوراه فلسفة في
علوم الحياة / فرع النبات

مرغد نواف جرجيس الزبيدي

بإشرافه

أ.م. د. جوى ابراهيم البرهاوي

أ.م. د. عبدالله نجم النعيمي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَأَنْ لَيْسَ لِلْإِنْسَانِ إِلَّا مَا سَعَى ﴾ (٣٩) وَأَنْ سَعِيدٌ سَوْفَ يُرَى
(٤٠) ثُمَّ يُجْزَأُ الْجَزَاءَ الْأَوْفَى (٤١) وَأَنْ إِلَىٰ رَبِّكَ الْمُنْتَهَى (٤٢)
وَأَنْهُ هُوَ أَضْحَكَ وَأَبْكَى ﴿ (٤٣)﴾

سُورَةُ النَّجْمِ

﴿ آيَاتُ ٣٩-٤٣ ﴾

شكر و عرفان

يا ربّ لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك ، مرضينا بالله رباً وبالإسلام ديناً
وبمحمدٍ صلى الله عليه وسلم نبياً ومرسولاً . والصلاة والسلام على رسول الله وعلى آله وأصحابه ومن
دعا بدعوته واستنّ بسنته إلى يوم الدين .

فإنه لا يسعني وأنا أضع اللمسات الأخيرة لبحثي هذا ، إلا أن أتقدم بفائق شكري وامتناني
لأستاذي الفاضل الدكتور عبد الله نجم النعيمي ولأستاذتي الفاضلة الدكتورة نجوى البرهاوي
لاقتراحهما موضوع البحث وإشرافهما عليه وتشجيعهما المتواصل لي وللمحوظاتهما القيمة التي كان لها
الأثر الكبير في إكمال هذه الدراسة .

وأتقدم بشكري واعتزاني إلى عمادة كلية التربية ورئاسة قسم علوم الحياة . وإلى اساتذة
ومنتسبي قسم علوم الحياة .

وشكري موصول إلى السيد محمد نوح في مختبر البحوث لقسم التحليلات
المرضية/المعهد التقني ، لتقديمه لي التسهيلات خاصة في استعمال اجهزة PCR وتحليل نواتج العينات
فجزاه الله عني خير الجزاء . ، وإلى من مرافقني من طلبة الدراسات العليا عرفاناً .

ومسك الحتام اقدم باقة ومرد عطرها حيي وامتناني لمن قلت فيها للدنيا اشهدي بأني سأذكر
مامضى بنا من ايام أجمل من ان تصوغها كلماتي ولمن وجدت فيها حسن الخصال ومروح الكمال
الأخت د . شمال يونس الجبوري فيارب اكرمها وارفع لها قدرا وذكرا .
وفي الحتام أسأل الله عز وجل أن يتقبل هذا العمل المتواضع خالصاً لوجهه الكريم وأن يثبتنا
على دينه إنه نعم المولى ونعم النصير .

الباحثة

إِلَهَاء

إلى إمام الذَّاكِرِينَ وَقَدْوَةِ الْمَالِكِينَ وَمَعْلَمِ الْمُعَلِّمِينَ...

(سَيِّدِنَا مُحَمَّدٌ ﷺ)

إلى رمز البرِّ والوفاء مع الدَّعَاءِ لهما... إلى من جَلَّتْ قُدْرَتُهُ وَوَسَّعَتْ رَحْمَتُهُ كُلَّ شَيْءٍ أَنْ يَرْحَمَهُمَا كَمَا رَبَّيَانِي صَغِيرًا...

(والديَّ العزيزين)

إلى من له في قلبي أسمى المعاني... إلى من هو بسمته حياتي... إلى من أرى في عيونهِ ما خفي وما بان...

(محمد الغالي)

إلى الذين وجدت فيهم روح المحبة والإخلاص... إلى من توجَّعت بينهم بتأج العزة والكبرياء... إلى نجوم سمائي...

(إخوتي وأخواتي)

رَحْمَةُ نَوَافِ الزَّيْدِي

الخلاصة

عنيت الدراسة الحالية ابتداءً، بعزل جنسين مختلفين من البكتريا العائدة لعائلة *Rhizobiaceae* وهما *Agrobacterium tumefaciens* من الاورام التاجية المتكونة على سيقان نباتات الاس المتواجدة في حديقة كلية التربية، واعطي لها الرمز *A.tumefaciens* (AtMco1) وبكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية المتكونة على اربعة ضروب من نباتات الجت *Medicago sativa* واعطي لها الرموز Rh1 ، Rh2 ، Rh3 و Rh4. وشخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية والزربية والاختبارات الكيموحيوية والبايولوجية وبنوعها الامراضية والتعايشية، وعززت بنتائج التشخيص الجزيئي بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز للحامض النووي البلازميدي المعزول من عزلات الرايزوبيوم من السلالة البرية *A.tumefaciens* (AtMco1) فضلاً عن السلالة القياسية (*A.tumefaciens* C58C1) بوصفها عينة مقارنة، وبعد تضخيمه بتقانة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا DNA Polymerase chain reaction of DNA (sPCR) وباستعمال بادئات متخصصة، لوحظ انفصال حزمة واحدة عائدة للجين *rol B* وبوزن جزيئي 900 bp في كل من العزلة البرية والسلالة المحولة وراثياً.

ويعد تشخيص عزلات *S. meliloti* باستعمال الاختبارات الكيموحيوية والبايولوجية واختبارات الحساسية أنتختب العزلة Rh1 في انجاز التجارب الوراثة اللاحقة، اذ اعتمد على امتلاكها او فقدانها لصفة المقاومة للمضادات الحيوية الاثنيتي عشرة بوصفها دلائل وراثية لاثبات تحييدها بالاكريدين البرتقالي واستعمالها بكتريا مستلمة وواهة في عملية الاقتران لاثبات حالة الانتقال الافقي للجينات بين الجنسين المذكورين. وقد دعمت نتائج نجاح الاقتران، بملاحظة تكوين العقد الجذرية والاورام التاجية على بادرات نباتات الجت بكل من Transconjcant *Agrobacterium* و Transconjcant *Rhizobium* الناتجين من الاقتران على التعاقب.

وقد اكدت نتائج عزل وتوصيف محتوى DNA البلازميدي على انتقال الحمض النووي البلازميدي من الخلايا الواهة الى الخلايا المستلمة وارتفاع تركيزه في الخلايا المقترنة. وأحرزت النتائج ضمن هذا السياق، امتلاك العزلة البرية *Agrobacterium tumefaciens* (AtMco1) على بلازميد واحد والعزلة القياسية على بلازميدين وامتلاك العزلتين (Rh4, Rh1) على بلازميد واحد في حين امتلكت العزلتين (Rh3, Rh2) على بلازميدين عند ترحيلها على هلام الاكاروز، وعند تضخيم DNA البلازميدي لبكتريا الرايزوبيوم الناتجة من الاقتران بتقنية Specific-PCR وذلك ببادئات متخصصة، أكدت النتائج وبشكل قاطع امتلاك هذه البكتريا

لبلازميد Ti-Plasmid بالكشف عن الجين *rol B* المحمول على قطعة الـ T-DNA حين الترحيل على هلام الاكاروز.

أما في مجال الزراعة النسيجية، فقد تميزت اوساط MS المدعمة بمنظمات النمو الاتية Kin (0.1 ملغم/لتر) + 2,4-D (0.5 ملغم/لتر) و Kin (2.0 ملغم/لتر) + 2,4-D (1.0 ملغم/لتر)، في استحداث الكالس من الاوراق والجذور وبنسبة 90، 100% على التعاقب، ومن جانب آخر تمكن الوسط المدعم Kin (2.0 ملغم/لتر) + 2,4-D (2.0 ملغم/لتر) من استحداث الكالس من قطع السيقان تحت الفلجية لهذه البادرات، فضلاً عن تكوين الافرع الخضرية عليها وبأعداد وصلت لغاية 24 فرع وبنسبة مئوية بلغت 20%، وبمرحلة واحدة وسخرت الانظمة الكفوءة كافة لاستئصال مسار التحول الوراثي في نباتات الجت بالاكروبيكتريوم ناقلاً طبيعياً، ومن النتائج البارزة المتحققة في هذا الجانب، ايجاد بروتوكول كفوء لانتاج الافرع الخضرية المحولة وراثياً وذلك بطريقة الحقن المباشر وباستعمال كثافات مختلفة من اللقاح البكتيري، وتمثل ذلك في استحداث الاورام التاجية على قطع السيقان تحت الفلجية في 12 يوماً من الحقن، وعلى البادرات المحقونة التي امتازت الاورام المتكونة عليها بسرعة تكوينها وامتداد ظهورها الى مواقع اخرى غير ملقحة تجاوزت العقد الفلجية في ثلاثة عشر يوماً فقط من الاصابة واتسمت قطع الاورام المستأصلة مع جزء من الساق، بقابليتها على النمو وتطورها الى مزارع أنموذجية من الكالس المحول وراثياً من الاورام التاجية على وسط MS 1/2 وبأعلى نسبة وصلت الى 62.2%.

ومن أهم الحقائق التي برهنت على نجاح التحول الوراثي للكالس المشتق من الاورام التاجية قدرته على النمو والتكاثر على الاوساط الانتخائية الحاوية على Rifampicin و Gentamycin وبتركيز 40، 100 ملغم/لتر على التعاقب، فضلاً عن قدرة الافرع الخضرية الناتجة من الاورام التاجية على النمو على وسط MSO المدعم بالمضادين الحيويين اعلاه واستمرار نموها واعطائها افرعاً اضافية لاكثر من اربعة اسابيع. وعززت هذه النتائج احتمالية انتقال الجينات المحمولة على قطعة الـ T-DNA لبلازميد Ti-Plasmid من البكتريا الى هذه الانسجة النباتية، ولاثبات ذلك عند المستوى الجزيئي عُرل الحمض النووي الجينومي من انسجة الاورام التاجية وكالسها والافرع الخضرية المتميزة عنها، ثم ضخ الحامض النووي المعزول بوساطة PCR ببيادئات متخصصة للجين *rol B* المرتبط بجين المقاومة لمضاد الريفاميسين المحمولة على قطع T-DNA المتوقع حشرها داخل جينوم خلايا انسجة نباتات الجت، اذ أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز انفصال حزمة واحدة من كل عينة لتمثل القطعة المضخمة للجين *rol B* ومطابق للوزن الجزيئي 900 bp للبيادئات المستعملة قياسياً علماً بان هذه الحزم لم تظهر في عينات المقارنة المضخمة. ويفسر ظهور عدد من التغيرات

المظهرية فضلاً عن الوراثة في الافرع الخضرية نجاح انتقال جينات T-DNA والتعبير عن نفسها في هذه الانسجة المحولة وراثياً.

وأوضحت نتائج الكشف عن الاحماض الأمينية الغير اعتيادية (Nopaline ,Octopine) في انسجة الاورام التاجية الناشئة بفعل كل من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* البرية والمهندسة وراثياً وكالسها كشفاً موجباً بدلالة انفصال بقع الاوبينات في مواقع مناظرة لمواقع بقع الاوبينات القياسية الوارد ذكرها انفاً، وجاءت نتائج هذا الجانب لتكشف عن التحول الوراثي لانسجة هذه الاورام المحفزة بفعل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* بنمطها البري والمهندس وراثياً والكالس المشتق منها ولتشخص نوع البلازميد المحمول في السلالتين كلتيهما اذ افرزت النتائج عن امتلاك السلالة القياسية لبلازميد من نوع Nopaline type والعزلة البرية لبلازميد من نوع Octopine type.

الصفحة	الموضوع	التسلسل
	الفصل الأول المقدمة	
4-1	المقدمة	.1
42-5	الفصل الثاني استعراض المراجع	
5	عائلة Rhizobiaceae	1.2
5	جنس <i>Agrobacterium</i>	2.2
7	ميكانيكية إصابة بكتيريا <i>A.tumefaciens</i> للنباتات وتكوين الاورام التاجية عليها	3.2
8	الأساس الجزيئي للتحويل الوراثي بالأكروبيكتريوم	4.2
10	المجاميع الجينية لبلازميدات Ti	1.4.2
13	آلية انتقال قطعة الـ T-DNA الى الخلية النباتية	2.4.2
15	تقانات التحويل الوراثي في النباتات	3.4.2
15	التحويل الوراثي باستعمال الأكروبيكتريوم	4.4.2
17	دلائل حدوث التحويل الوراثي في الانسجة النباتية	5.4.2
19	التحويل الوراثي الحيوي في العائلة البقولية بوساطة الأكروبيكتريوم	6.4.2
23	جنس <i>Rhizobium</i>	5.2
24	تصنيف بكتريا الرايزوبيوم	1.5.2
25	التقنيات المستعملة في تشخيص بكتريا الرايزوبيا	2.5.2
26	ميكانيكية إصابة النباتات البقولية ببكتريا الرايزوبيا وتفسيراتها الوراثية	3.5.2
29	آلية تثبيت النتروجين	4.5.2
30	بلازميدات بكتريا الرايزوبيوم ودورها في العلاقة التعايشية	5.5.2

قائمة المحتويات

32	آليات الانتقال الأفقي للجينات	6.2
34	الإقتران في عائلة Rhizobaceae	7.2
36	إعتماد نباتات الجت موديلاً لفهم العلاقات على المستوى الوراثي	8.2
37	الزراعة النسيجية للنباتات التابعة للعائلة البقولية	9.2
40	التفاعل التضاعفي المتسلسل لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction PCR	10.2
41	خطوات التفاعل التضاعفي لسلسلة الـDNA	1.10.2
84-43	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	
43	تحضير الأوساط الغذائية	1.3
43	الأوساط الزرعية المجهزة تجارياً	1.1.3
43	الأوساط الزرعية المحضرة مختبرياً	2.1.3
45	الصبغات والكواشف والمحاليل	2.3
45	الصبغات	1.2.3
45	الكواشف	2.2.3
46	المحاليل	3.2.3
47	السلالة البكتيرية القياسية المستخدمة في الدراسة	3.3
47	عزل بكتريا <i>Agrobacterium tumefaciens</i> وتشخيصها من الأورام التاجية المتكونة على نباتات الآس واختبار قدرتها الأمراضية	4.3
47	عزل بكتريا <i>Agrobacterium tumefaciens</i> من الأورام التاجية	1.4.3
47	عزل بكتريا <i>Agrobacterium tumefaciens</i> من العالق البكتيري وزراعتها	2.4.3
48	تشخيص بكتريا <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3.4.3
48	الصفات الزرعية	1.3.4.3

قائمة المحتويات

48	الفحص المجهري	2.3.4.3
48	الإختبارات الكيموحيوية	3.3.4.3
52	تحضير اللقاحات البكتيرية وتقدير كثافته طيفياً	4.3.4.3
53	حفظ مزارع البكتريا في محلول الكليسرول	5.3.4.3
53	دراسة القدرة الأمراضية للبكتريا على اصابة النباتات وتكوين الأورام التاجية لها	6.3.4.2
54	عزل بكتريا <i>Sinorhizobium meliloti</i> من العقد الجذرية لنباتات الجت وتشخيصها	5.3
54	عزل بكتريا <i>Sinorhizobium meliloti</i>	1.5.3
55	تشخيص بكتريا <i>Sinorhizobium meliloti</i>	2.5.3
55	الفحص المجهري	1.2.5.3
55	الإختبارات الكيموحيوية	3.5.3
56	إختبار قابلية العزلات المختلفة من بكتريا <i>S. meliloti</i> على تكوين العقد الجذرية المثبتة للنتروجين على بادرات الجت <i>Medicago sativa</i>	4.5.3
56	مصدر البذور	1.4.5.3
57	التعقيم السطحي لبذور الجت	2.4.5.3
57	انبات بذور الجت في الوسط الغذائي والحصول على البادرات الملقحة	3.4.5.3
57	إختبار التخصص العائلي لعزلات بكتريا <i>S. meliloti</i>	4.4.5.3
58	إعادة عزل بكتريا <i>S. meliloti</i> من العقد الجذرية المتكونة على جذور نباتات الجت	1.4.4.5.3
58	تلقيح الشعيرات الجذرية لبادرات الأصناف الاربعة من نباتات الجت ببكتريا <i>S. meliloti</i> البرية من العقد الجذرية المتكونة عليها بشكل متبادل	2.4.4.5.3
59	فحص المجموع الجذري للبادرات بالمجهر الضوئي وتصويرها	3.4.4.5.3
59	تقدير المحتوى البروتيني	4.4.4.5.3

قائمة المحتويات

61	التحول الوراثي في البكتريا بطريقة الأقران	6.3
61	اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية	1.6.3
62	تحديد محتوى الـ DNA البلازميدي لبكتريا <i>S. meliloti</i> و <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحوّلة وراثياً	2.6.3
62	التحديد التلقائي	1.2.6.3
63	التحديد المستحث للبلازميدات في بكتريا <i>S. meliloti</i> و <i>A. tumefaciens</i> باستخدام صبغة الأكردين البرتقالي	2.2.6.3
64	تلقيح الشعيرات الجذرية لبادرات الجت ببكتريا <i>S.meliloti</i> المحيدة	3.2.6.3
64	تلقيح العائل النباتي ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> المحيدة	4.2.6.3
64	قابلية محتوى الـ DNA البلازميدي في بكتريا <i>S.meliloti</i> وبكتريا <i>A.tumefaciens</i> على الحركة والانتقال بالاقتران.	3.6.3
65	إعداد المعلقات البكتيرية وتحضيرها	1.3.6.3
65	إحداث الأقران بين <i>A.tumefaciens</i> البرية والمحوّلة وراثياً (الواهبة) و <i>S.mililoti</i> (المستلمة)	2.3.6.3
65	إحداث الإقتران بين <i>S.mililoti</i> (الواهبة) و <i>A.tumefaciens</i> البرية والمحوّلة وراثياً (المستلمة)	3.3.6.3
66	اختبار الانواع البكتيرية الناتجة من الاقتران	4.3.6.3
67	الزراعة النسيجية لنباتات الجت	7.3
67	تكوين مزارع كالس أجزاء بادرات الجت وأدامتها	1.7.3
68	تقدير الأوزان الرطبة للكالس	2.7.3
68	تمايز كالس السيقان تحت الفلقية الى نباتات الجت الكاملة	3.7.3
68	تكوين الأفرع الخضرية	1.3.7.3
68	تكوين المجاميع الجذرية للأفرع الخضرية الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية	2.3.7.3
69	تكوين نباتات الجت <i>M.sativa</i> مباشرة من انسجته المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحوّلة	8.3

قائمة المحتويات

	وراثياً	
69	الكشف عن بقاء العلام الوراثية (Rest ⁺ ، Rif ، Gen Ti لبكتريا <i>A.tumefaciens</i> (Rest ⁺) في بلازميدات	1.8.3
69	تكوين الأورام التاجية على بادرات نباتات الجت بواسطة بكتريا <i>A.tumefaciens</i>	2.8.3
69	إنتخاب العمر المناسب والكثافة الضوئية للقاح البكتريا الملائم لحقن البادرات	1.2.8.3
70	تلقيح قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات الجت	2.2.8.3
70	بروتوكول عملية التحول الوراثي لبادرات نباتات الجت	3.8.3
70	إعتماد مزارع الأورام التاجية مصدراً للحصول على النباتات المحولة وراثياً	1.3.8.3
70	استخدام تقانة الحقن المباشر	1.1.3.8.3
70	استحداث الأورام التاجية على البادرات الملقحة وسيقاتها وتكوين مزارعها الخالية من البكتريا	2.1.3.8.3
71	إختبار خلو الأورام التاجية من بكتريا <i>A.tumefaciens</i>	3.1.3.8.3
71	استحداث مزارع الكالس من الأورام التاجية المحولة وراثياً	4.1.3.8.3
71	تكوين الأفرع الخضرية من كالس الأورام التاجية	5.1.3.8.3
72	إختبار تحمل الأفرع الخضرية المتميزة من كالس الأورام التاجية للريفامبسين والجينتاميسين	6.1.3.8.3
72	إختبار تحمل كالس الأورام التاجية المحولة وراثياً للريفامبسين والجينتاميسين	7.1.3.8.3
72	نقل النباتات الى وسط الأستطالة	8.1.3.8.3
72	التكوين المباشر للأفرع الخضرية المحولة وراثياً من الأورام التاجية المتكونة على البادرات المحقونة بالأكروبيكتريوم	9.1.3.8.3
73	تقانة كروماتوغرافيا الورق النازل في الكشف عن الابيينات (Octopine, Napoline) في انسجة وكالس الاورام التاجية	10.1.3.8.3

قائمة المحتويات

73	الدراسة عند المستوى الجزيئي	9.3
73	الكشف عن محتوى الـ DNA البلازميدي في بكتريا <i>S. meliloti</i> و <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحوّلة وراثياً	1.9.3
73	عزل الـ DNA البلازميدي وتنقيته	1.1.9.3
75	الترحيل الكهربائي لنماذج الـ DNA البلازميدي	2.1.9.3
76	تقدير تراكيز ونقاوة الـ DNA البلازميدي المعزول	3.1.9.3
77	استخلاص الحمض النووي المنقوص الأوكسجين الكروموسومي من النبات	2.9.3
77	مرحلة عزل الـ DNA	1.2.9.3
77	مرحلة غسل وتنقية الـ DNA	2.2.9.3
78	فحوصات السيطرة النوعية	3.9.3
78	تقدير تراكيز الحمض النووي الجينومي gDNA المستخلص ونقاوته	1.3.9.3
78	الترحيل على هلام الاكاروز	2.3.9.3
79	تقدير الاوزان الجزيئية	4.9.3
80	التشخيص الجزيئي بتقانة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا الـ Specific PCR	5.9.3
80	التشخيص الجزيئي لبكتريا <i>A. tumefaciens</i> المكونة للاورام التاجية والمعزولة من الاورام التاجية لنباتات الآس <i>Myrtus Communis</i> بتقانة الـ sPCR	1.5.9.3
80	التحري عن الجين <i>rol B</i> في البكتريا الناتجة من اقتران <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحوّلة وراثياً مع <i>S. meliloti</i>	2.5.9.3
80	التحري الجزيئي عن احتفاظ جينوم الانسجة المحوّلة وراثياً بجينات T-DNA لبكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحوّلة وراثياً بالكشف عن الجين <i>rol B</i>	3.5.9.3
81	المواد والمحاليل المستخدمة في اجراء تفاعل الـ sPCR	4.5.9.3

قائمة المحتويات

83	خطوات التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا sPCR	5.5.9.3
83	التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا للعينات البكتيرية	1.5.5.9.3
84	خطوات التفاعل في الانسجة النباتية	2.5.5.9.3
162-85	الفصل الرابع النتائج	
85	عزل وتشخيص بكتريا <i>A. tumefaciens</i> من الأورام التاجية لنباتات الآس <i>Myrtus communsi</i>	1.4
85	الصفات المورفولوجية والزراعية	1.1.4
85	اختبار النمو على الأوساط القياسية	2.1.4
86	الإختبارات الكيموحيوية	3.1.4
87	اختبار القدرة المرضية للبكتريا المعزولة	4.1.4
87	اختبار القدرة المرضية للبكتريا على إصابة بادرات نباتي زهرة الشمس <i>Helianthus annuus</i> والطماطة <i>Lycopersicon escaletum</i>	1.4.1.4
89	اختبار القدرة الإراضية على اقراص البطاطا والجزر	2.4.1.4
91	الإختبارات الكيموحيوية لتحديد الطراز الحيوي	5.1.4
92	عزل وتشخيص بكتريا <i>Rhizobium</i> من العقد الجذرية لنباتات الجت <i>M. sativa</i>	2.4
92	الصفات المورفولوجية والزراعية لبكتريا الرايزوبيوم المعزولة	1.2.4
92	الإختبارات الكيموحيوية	2.2.4
93	اختبار التخصص العائلي لبكتريا الرايزوبيا المعزولة	3.2.4
93	تكوين العقد الجذرية في بادرات الجت الملقحة ببكتريا	1.3.2.4

قائمة المحتويات

	<i>S. meliloti</i> (Rh1) المعزولة من نباتات الجت (الصف العراقي)	
94	تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh3) المعزولة من نباتات الجت (الصف الباكستاني)	2.3.2.4
97	تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh2) المعزولة من نباتات الجت (الصف البلجيكي)	3.3.2.4
99	تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh4) المعزولة من نباتات الجت (الصف الأمريكي)	4.3.2.4
103	تحديد كفاءة عزلات <i>S. meliloti</i> المعزولة على تكوين العقد الجذرية لاصناف نباتات الجت الاربعة	5.3.2.4
103	التأكد من كفاءة البكتريا المعزولة من العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت	6.3.2.4
104	كفاءة الحصول على بادرات الجت المعقمة من البذور	3.4
104	تكوين مزارع كالس الاجزاء النباتية	4.4
107	إدامة كالس الأجزاء المختلفة لبادرات الجت وتقدير الأوزان الطرية للكالس	5.4
107	إستخدام وسط B5	6.4
108	انتاج الأفرع الخضرية لنباتات الجت <i>M. sativa</i>	7.4
108	تكوين الأفرع الخضرية من كالس السيقان تحت الفلقية	1.7.4
108	الصفات المظهرية للنباتات الناتجة من كالس السيقان البذرية	2.7.4

قائمة المحتويات

109	تجذير الافرع الخضرية	3.7.4
110	مقاومة بكتريا <i>Rhizobium</i> و <i>Agrobacterium</i> المعزولة للمضادات الحيوية	8.4
111	تحديد محتوى الـ DNA البلازميدي في بكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً و <i>S. meliloti</i>	9.4
111	التحديد التلقائي	1.9.4
113	التحديد المستحث باستعمال الأكردين البرتقالي	2.9.4
115	قابلية الـ DNA البلازميدي في بكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً و <i>S. meliloti</i> على الحركة والإنتقال الافقي بالإقتران	10.4
115	الإقتران بين بكتريا <i>S. meliloti</i> (بوصفها خلايا واهبة) و <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً (بوصفها خلايا مستلمة).	1.10.4
116	الإقتران بين <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً (بوصفها خلايا واهبة) و <i>S. meliloti</i> (بوصفها خلايا مستلمة)	2.10.4
117	الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا المقترنة	3.10.4
119	تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني في بادرات الجت <i>M. sativa</i> الملقحة ببكتريا <i>Sinorhizobium</i> <i>Transconjugant Agrobacterium</i> و <i>meliloti</i>	4.10.4
120	تكوين العقد الجذرية على بادرات الجت الملقحة بالبكتريا المقترنة والمعاد عزلها من العقد	5.10.4
121	تكوين التراكيب الشبيهة بالاورام <i>Tumor-like</i> <i>structures</i> على جذور بادرات الجت بوساطة	6.10.4

قائمة المحتويات

	Transconjugant Sinorhizobium	
125	التلقيح المباشر لبادرات الجت ببكتريا Transconjugant Sinorhizobium	7.10.4
127	الدلائل الجزيئية لحدوث الانتقال الأفقي للجينات بين <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً و <i>S.meliloti</i>	11.4
127	تقدير قيم تراكيز الـDNA البلازميدي ونقاوته في بكتريا <i>S. meliloti</i> و <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة والناتجة من الاقتران	1.11.4
128	توصيف محتوى الـDNA البلازميدي لبكتريا <i>S. meliloti</i> و <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً والمقترنة بوساطة الترحيل على هلام الاكاروز	2.11.4
134	التشخيص عند المستوى الجزيئي لعزلة الاكروبيكتريوم بتقانة Specific- PCR	3.11.4
134	التشخيص عند المستوى الجزيئي للعزلات المقترنة بتقانة Transconjugant Sinorhizobium Specific- PCR	4.11.4
138	تضمين جينات T-DNA من بكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية و المحولة وراثياً في انسجة الجت <i>Medicago</i> <i>sativa</i> وتكوين النباتات من مزارع الأورام التاجية وكالسها	12.4
138	احتفاظ البكتريا بعلائمها الوراثية	1.12.4
138	انتخاب العمر المناسب لحقن بادرات الجت	2.12.4
139	انتخاب الكثافة الضوئية للقاح البكتيري لاستحثاث الاورام التاجية على بادرات الجت <i>M. sativa</i> بالحقن المباشر ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً	3.12.4

قائمة المحتويات

140	استحثاث تكوين الاورام التاجية على السيقان تحت الفلقية المستأصلة من بادرات الجت <i>M. sativa</i> بحقتها المباشر ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً	4.12.4
141	التكوين التلقائي للأفرع الخضرية من الانسجة المحولة وراثياً والمنتجة للاوبين (Nopaline, Octopine) ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً	5.12.4
141	الاورام التاجية المحولة وراثياً الناشئة على البادرات الملقحة	1.5.12.4
144	من الاورام التاجية لقطع السيقان تحت الفلقية الملقحة	2.5.12.4
147	تكوين نباتات الجت المحولة وراثياً من مزارع كالس الاورام التاجية	6.12.4
147	انشاء مزارع الاورام التاجية الخالية من بكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً على وسط MSO الصلب وادامتها	1.6.12.4
147	استحداث كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً على الاوساط الخالية والمدمعة بمنظمات النمو	2.6.12.4
148	ادامة كالس الاورام التاجية المحول وراثياً وتقدير اوزانه الطرية	3.6.12.4
149	تمايز كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً لتكوين الافرع الخضرية	4.6.12.4
149	تحفيز استطالة الافرع الخضرية في وسط الاستطالة	5.6.12.4
152	الدلائل المظهرية والوراثية للتحويل الوراثي في انسجة نباتات الجت <i>M. sativa</i>	13.4

قائمة المحتويات

152	اختلاف الصفات المظهرية والوراثية لكالس الاورام التاجية المحول وراثياً عن نظيره الناتج عن السيقان تحت الفلقية	1.13.4
153	نمو كالس الاورام التاجية المحول وراثياً في الاوساط الانتخابية المدعمة بالمضادين الحيويين الريفامبيسين والجينتاميسين	2.13.4
153	قدرة الافرع الخضرية المتمايزة من الاورام التاجية وكالسها المحول وراثياً من النمو في الاوساط الانتخابية الحاوية على الريفامبيسين والجينتاميسين	3.13.4
154	الكشف عن نوع الاوبين (Nopaline, Octopine) في انسجة الاورام التاجية والكالس المشتق منها، وتحديد النمط الوراثي للبكتريا (الكروماتوكرافي النازل)	4.13.4
156	الكشف عن التحول الوراثي لنباتات الجت عند المستوى الجزيئي	14.4
156	تركيز الحمض النووي DNA المعزول من الانسجة النباتية لنباتات الجت <i>M. sativa</i> المحولة وراثياً ونقاوته	1.14.4
158	ثبات التعبير الجيني لجينات T-DNA في انسجة نباتات الجت <i>M. Sativa</i> المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحوّلة وراثياً	2.14.4
192-164	الفصل الخامس المناقشة	
194-193	الاستنتاجات والتوصيات	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
43	أنواع الأوساط الغذائية الجاهزة	1
44	أنواع الأوساط الغذائية المحضرة ومصادرها والغرض من استخدامها	2
55	عزلات الرايزوبيوم البرية من العقد الجذرية لاصناف نباتات الجت ومصادرها	3
62	المضادات الحيوية المستخدمة ورموزها وتراكيزها الخزينة والنهائية ومذيباتها	4
64	اجناس البكتريا المستخدمة في تجارب الإقتران وأوساطها وعلائمها الوراثة	5
74	مكونات عدة العمل الجاهزة لعزل DNA البلازميدي وتنقيته	6
76	مكونات عدة العمل الجاهزة لاستخلاص DNA النبات	7
81	مكونات PCR premix المجهز من شركة Bioneer	8
82	المتطلبات الاساسية لانجاز التفاعل التسلسلي البوليميري sPCR في تجارب البكتريا.	9
82	المتطلبات الاساسية لانجاز التفاعل التسلسلي البوليميري sPCR (في الانسجة النباتية المحولة وراثياً)	10
83	برنامج تفاعل البلمرة المتدرج الحراري المستخدم في هذه الدراسة (Gradient PCR)	11
85	نمو بكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً (معاملة المقارنة) على الأوساط الإنتخابية	12
86	الإختبارات البايوكيميائية للبكتريا المعزولة والمحولة وراثياً (معاملة المقارنة)	13
87	اختبارات القدرة الإمراضية للبكتريا المعزولة من الأورام التاجية لنباتات الآس على تكوين الأورام في اربع نباتات مختلفة	14
91	الإختبارات البايوكيميائية والتشخيصية لتحديد الطراز الحيوي Biovar للبكتريا المعزولة والمحولة وراثياً (القياسية)	15

قائمة الجداول

93	الإختبارات البايوكيميائية لعزلات بكتريا <i>S.meliloti</i> قيد الدراسة	16
94	العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت <i>M. sativa</i> الملقحة ببكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh1)	17
95	العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت <i>M. sativa</i> الملقحة ببكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh3)	18
98	العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت <i>M. sativa</i> الملقحة ببكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh2)	19
99	العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت <i>M. sativa</i> الملقحة ببكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh4)	20
103	كفاءة عزلات بكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh1, Rh2, Rh3, Rh4) في تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني لبادرات اصناف <i>M. sativa</i> الجت	21
104	كفاءة التعقيم السطحي لبذور نباتات الجت باستخدام هايبيوكلورايت الصوديوم بتركيز 2% ولمدة 5 دقائق في تكوين البادرات السليمة	22
105	تأثير مجموعة من تداخلات منظمات النمو في وسط الاستحداث MS الصلب في تكوين مزارع كالس الاجزاء النباتية المستأصلة من بادرات الجت <i>M.sativa</i> المعقمة	23
107	تقدير الأوزان الطرية لكالس الأجزاء المختلفة لنباتات الجت على وسط MS الصلب مدعماً بإضافة التراكيز المنتخبة لكل جزء نباتي في مدة نمو 30 يوماً	24
108	تكوين الأفرع الخضرية لنباتات الجت <i>M.sativa</i> من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية وبمرحلة واحدة	25
108	الصفات المظهرية للنباتات الناتجة من مزارع كالس السيقان تحت الفلقية ونظيرتها الناتجة من البذور	26
110	اختبار حساسية بكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً و <i>S.meliloti</i> المعزولة من نباتات الجت <i>Alfalfa</i> للمضادات	27

قائمة الجداول

	الحياتية	
112	تحديد مقاومة المضادات الحيوية في المستعمرات البكتيرية تلقائياً	28
114	تحديد مقاومة المستعمرات البكتيرية للمضادات الحيوية باستخدام الأكردين البرتقالي $\mu\text{g/ml}$ (500) لبكتريا <i>A.tumefaciens</i> و $\mu\text{g/ml}$ (50) لبكتريا <i>S.meliloti</i>	29
116	الاقتران البكتيري بين <i>S. meliloti</i> (كخلايا واهبة) و <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً (كخلايا مستلمة)	30
117	اقتران بكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً (كخلايا واهبة) مع بكتريا <i>S. meliloti</i> (كخلايا مستلمة)	31
118	الاختبارات البايوكيميائية للبكتريا المقترنة Tranconjugant bacteria	32
120	قدرة البكتريا المقترنة Transconjugant Agrobacterium على تكوين العقد الجذرية على جذور بادرات الجت <i>M. sativa</i>	33
121	قدرة البكتريا المقترنة Transconjugant Agrobacterium المعاد عزلها من العقد على تكوين العقد الجذرية على بادرات الجت <i>M. sativa</i>	34
122	تكوين التراكيب الشبيهة بالأورام Tumor-like structures على جذور بادرات الجت الملقحة ببكتريا Transconjugant Sinorhizobium	35
126	قدرة البكتريا المقترنة Transconjugant Sinorhizobium على تكوين الأورام التاجية على سيقان بادرات الجت <i>M.sativa</i>	36
128	قيم تراكيز الـ DNA البلازميدي المعزول من بكتريا <i>S. meliloti</i> و <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة والناجمة من الاقتران	37
137	القراءة الرقمية لنواتج تضخيم الـ DNA البلازميدي لعينات بكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية و Transconjugant sinorhizobium الناتجة من الاقتران باستخدام الباديء (CPR)	38

قائمة الجداول

	CPF) وفق برنامج CS Analyzer.3.1	
138	انتخاب العمر المناسب لحقن البادرات بلقاح بكتريا <i>A. tumefaciens</i> (C58C1)	39
140	استجابة بادرات الجت <i>M. sativa</i> للتلقيح المباشر بكثافات متباينة من لقاح بكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً	40
141	استجابة قطع السيقان تحت الفلقية المستأصلة من بادرات الجت <i>M. sativa</i> للتلقيح بالحقن المباشر بكثافات متباينة من لقاح بكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً	41
142	التكوين المباشر للافرع الخضرية من الاورام التاجية المتكونة على بادرات نباتات للجت <i>M. sativa</i> (Nopaline, Octopine) المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً	42
144	التكوين المباشر للافرع الخضرية من الاورام التاجية المنتجة للـ (Nopaline, Octopine) المحولة وراثياً المتكونة على قطع السيقان تحت الفلقية لنباتات الجت <i>M. sativa</i> المصابة ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً	43
148	استحداث كالس الاورام التاجية لنباتات الجت <i>M. sativa</i> النامية على وسط 1/2 MS الصلب المزود بتراكيز متباينة من منظّمات النمو	44
148	تقدير الاوزان الطرية للكالس المشتق من الاورام التاجية لنباتات الجت <i>M. sativa</i>	45
149	تكوين الافرع الخضرية للجت <i>M. sativa</i> من مزارع كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة والمحولة وراثياً	46
152	اختلاف الصفات المظهرية بين الكالس الطبيعي للجت <i>M. sativa</i> وكالس الاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i>	47
154	نوع الاوبيينات المفصولة من مستخلصات الاورام التاجية للبادرات المحقونة ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والهندسة وراثياً	48

قائمة الجداول

	والكالس الناشيء منها.	
156	تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA المعزول من انسجة كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات الجت <i>M. sativa</i> وكالس الاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً والنباتات الناتجة منها	49
160	القراءة الرقمية لنواتج تضخيم الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة من انسجة نباتات الجت <i>M. sativa</i> المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> (AtMc01) البرية باستخدام الباديء (CPF،CPR)، CS Analyzer.3.1،	50
162	القراءة الرقمية لنواتج تضخيم الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة من انسجة نباتات الجت <i>M. sativa</i> المحولة وراثياً ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> (C58C1) القياسية باستخدام الباديء (CPF،CPR)، CS Analyzer.3.1،	51

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
9	التركيب الكيميائي للابوبينات	1
12	الخريطة الوراثية لبلازميد Ti Plasmid ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> (C58)	2
15	مخطط حدوث عملية التحول الوراثي في النباتات ببكتريا <i>A. tumefaciens</i> المستخدمة في الدراسة	3
29	مراحل حدوث العلاقة التكافلية بين بكتريا الرايزوبيوم والنبات البقولي	4
42	خطوات دورة التفاعل التضاعفي المتسلسل للـ PCR	5
60	المنحني القياسي للبروتين	6
75	خطوات عزل الـ DNA البلازميدي وتنقيته	7
79	الاوزان الجزيئية للدليل الحجمي المستخدم في الدراسة	8
89	اختبار القدرة الامراضية للبكتريا <i>A. tumefaciens</i> المعزولة ومعاملة المقارنة على تكوين الاورام التاجية على بادرات الطماطة <i>Helianthus Lycopersicon esculentum</i> وزهرة الشمس <i>annuus</i>	9
90	اختبار القدرة الامراضية <i>A. tumefaciens</i> للبكتريا المعزولة ومعاملة المقارنة على اقراص البطاطا والجزر	10
97	العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت <i>M.sativa</i> (باصنافه الاربعة) الملقحة بعزلات بكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh3, Rh1) على التعاقب.	11
101	العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت <i>M.sativa</i> (باصنافه الاربعة) الملقحة بعزلات بكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh4, Rh2) على التعاقب.	12
102	يوضح تباين المحتوى البروتيني للأفرع الخضرية لاصناف الجت الملقحة بعزلات بكتريا <i>S. meliloti</i> (Rh4, Rh3, Rh2, Rh1) المختلفة	13
106	تكوين مزارع الكالس من جذور واوراق نباتات الجت <i>M. sativa</i>	14

قائمة الأشكال

109	تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية وتمايز نباتات الجت في الوسط الزراعي	15
124	العقد الجذرية والتراكيب الشبيهة والاورام المتكونة على جذور بادرات الجت الملقحة بالبكتريا المقترنة.	16
126	الاورام التاجية الناشئة على بادرات الجت <i>M. Sativa</i> بالحقن المباشر ببكتريا <i>Transconjugant Sinorhizobium</i>	17
130	الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% للبكتريا الناتجة من الاقتران ما بين <i>Agrobacterium tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً و <i>Sinorhizobium meliloti</i>	18
131	الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% للبكتريا الناتجة من الاقتران ما بين <i>Agrobacterium</i> و <i>Sinorhizobium meliloti</i> البرية <i>tumefaciens</i> (AtMcol)	19
132	الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% للبكتريا الناتجة من الاقتران ما بين <i>Agrobacterium</i> و <i>Sinorhizobium meliloti</i> المحولة وراثياً <i>tumefaciens</i> (C58C1)	20
133	الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% لعزلات بكتريا <i>Sinorhizobium meliloti</i> الاربعة.	21
135	وجود الجين <i>rol-B</i> من عينة الـ DNA البلازميدي المضخمة المعزول من <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً بالترحيل الكهربائي من 1.5% من هلام الاكاروز.	22
136	وجود الجين <i>rol-B</i> في عينة الـ DNA البلازميدي المضخمة والمعزولة من <i>Transconjugant Sinorhizobium</i> (1,2) بالترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز 1.5%.	23

قائمة الأشكال

143	الاورام التاجية والأفرع الخضرية الناشئة على بادرات الجت <i>M. Sativa</i> بالحقن المباشر ببيكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً.	24
146	الاورام التاجية والأفرع الخضرية الناشئة على قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نباتات الجت المصابة ببيكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً، بالحقن المباشر.	25
151	استحداث وتمايز كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً (المستحدثة) ببيكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً على منطقة السيقان تحت الفلقية لبادرات الجت <i>M. sativa</i>	26
155	كروموتوكرافيا انفصال بقع الاوبيينات (Nopaline, Octopine) من مستخلصات الاورام التاجية لنباتات الجت <i>M. sativa</i> المستحثة ببيكتريا <i>A. tumefaciens</i> البرية والمحولة وراثياً والكالس المشتق منها	27
157	الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% لمحتوى الـ DNA الجينومي لكالس السيقان تحت الفلقية والاورام التاجية المحولة وراثياً ببيكتريا <i>Agrobacterium tumefaciens</i> والنباتات الناتجة منها	28
159	وجود الجين <i>rol-B</i> في عينات الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة من انسجة نباتات الجت <i>M. Sativa</i> المحولة وراثياً ببيكتريا (<i>AtMc01</i>) <i>A. tumefaciens</i> البرية بالترحيل الكهربائي 1.5% في الاكاروز.	29
161	وجود الجين <i>rol-B</i> في عينات الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة انسجة نباتات الجت <i>M. sativa</i> المحولة وراثياً ببيكتريا (<i>C58C1</i>) <i>A. tumefaciens</i> البرية باستخدام الترحيل الكهربائي 1.5% في الاكاروز	30

قائمة المختصرات

الرمز	اسم المختصر
$\mu\text{g/ml}$	Microgram / ml
<i>A. rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
D.W.	Distilled water
<i>et al</i>	And other
rpm	Cycle /minute
zit	Zeatin
GA3	Gibberellic acid
B5vit	Vitamine of gamborg medium
mg	Miligram
ml	Mililiter
NaOcl	Sodium hypochlorite
nm	nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNas	Ribonuclease
SPCR	Specific Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris boric buffer
UV	Ultra violet
Kbp	Kilo base pair
Mbp	Mega base pair
Tn	Transposable elements
<i>nif genes</i>	Nitrogen fixation genes
<i>nod genes</i>	Nodulation genes

قائمة المختصرات

pSym	Symbiosis plamid
F+/F-	Fertility plasmid
YEM	Yeast Extract Mannitol Medium
NF	Nitrogen Free Medium
<i>mob</i> genes	Mobilize gene
<i>ori</i> T	Origin of Transfer
<i>Tra</i> gene	Transfer genes
Hfr	High –frequency recombination
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
SCV	Soma Clonal Variations
<i>GUS</i>	β -glucuronidase
LOC	Lipooligosaccharide
lps	Lipopolysaccharide
kin	Kinetin
LB	Luria-Bertani medium
Taq polymerase	Thermos aquaticus polymerase
Tris-Hcl	Hydroxyl methyl
Chv	Chromosomal virulence
DPC	Discting paper chromatography
A.O	Acridine orange
NAA	Naphthalene acetic acid
<i>S. melilotti</i>	<i>Sinorhizobium melilotti</i>
Nod Factor	Nodulation factor
PDA	Potato Dextrose Agar

قائمة المختصرات

dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
CO1E1	Colicin plasmid E.coli
<i>R.l. bv. Trifoli</i>	Rhizobium leguminosarum biovar trifolii
NGA	Nutrient Glucose Agar medium
GPA	Glucose Peptone Agar medium
TY	Tryptone Yeast medium
YEB	Yeast Extract Beef medium
BSA	Bovine Serum Albumin
AM	<i>Agrobacterium</i> Mannitol medium
TSI	Tipple Sugar Iron medium
%	Percent
μm	Micrometer
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxy acetic acid
B5	Gamborg et al (1968) medium
BA	Benzyl adenine
DNA	Deoxyribo nucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid
IAA	Indole acetic acid
Ref Rest	Rifampicine Resistance
Gen Rest	Gentamycin Resistance
Chlo Rest	Chloramphenicol Resistance

قائمة المختصرات

Cef Rest	Cefotaxime Resistance
Tri Rest	Trimthprim Resistance
mgL ⁻¹	Miligram/Liter
MS	Murashig and Skoog (1962) basal medium
MSO	Hormon free MS medium
1/2 MSO	Half Strength hormone free MS medium
N	Normality
NAA	Naphthaene Acetic Acid
OD	Optical Density
<i>Onc genes</i>	Onco genecity genes
pH	Log 10 (H) ⁺
pRi	Root Inducing plasmid
pTi	Tumor Inducing Plasmid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T-DNA	Tranferred DNA
<i>Vir genes</i>	Virulence genes
WP	Lloyd and McCown (1980) basal medium for woody plants
1/2 WP	Half- Strength hormone free wp medium
NLS	Plant Nuclear Location
KDa	Killo Dalton
ATP	Adenosen Tri Phosphete
dsDNA	Double Strand DNA
MT	Melting Temperature



الأجهزة المستخدمة

استخدمت الاجهزة المدونة ادناه مع اسماء الشركات المجهزة ومنشأها

المنشأ	الشركة المجهزة	الجهاز المستخدم	ت
USA	Apple	iPad	.1
USA	Sigma-Aldrich	PCR-eppendroff tubes انايب ابندروف	.2
Belgium	Consort-EV-243	Electrophoresis الترحيل الكهربائي	.3
Italy	Unique	جهاز الاضاءة بالاشعة فوق البنفسجية UV. Transilluminator	.4
England	PhilipHorris	Autoclave جهاز تعقيم (مؤصدة)	.5
Germany	Memmert	Incubator حاضنة	.6
England	Gallenkamp	Shaker incubator حاضنة هزازة	.7
Germany	Memmert	Water bath حمام مائي	.8
Belgium	CYAN	Centrifuge طرد مركزي	.9
Germany	TÜV	Microcentrifuge®-18 طرد مركزي صغير	.10
Japan	UV-1650 PC-Shimadzu	طيف الاشعة فوق البنفسجية UV-Visible spectrophoto meter	.11
Germany	Memmert	Oven فرن كهربائي	.12
Japan	SONY	كاميرا رقمية	.13
Germany	Heidolph	Vortex المازج الدوار	.14
USA	Sigma-Aldrich	Micropipettes P(20,100,1000) ماصات دقيقة	.15
Japan	Bioner	Thermo cycler المبلمر الحراري	.16
Italy	Optika	Compound microscope مجهر ضوئي مركب	.17
Germany	Heidolph	Magnetic Stirrer with Hot plate محرك مغناطيسي مع هيتز	.18
England	Jenway	المطياف الضوئي ذو القطرة الدقيقة Spectrophotometer Biodrop	.19
France	Cecil	Spectrophotometer مطياف ضوئي	.20
England	Pye-Unicam	pH-meter مقياس الاس الهيدروجيني	.21
Germany	Sartorius	Sensitive balance ميزان حساس	.22
England	Shaudon	Chromatography paper ورق الكروماتوغرافيا	.23



المواد المستخدمة

جدول بالمواد الكيميائية التي استخدمت في البحث والشركات المجهزة والمنشأ

المنشأ	الشركة المجهزة	المادة المستخدمة	ت
USA	Sigma-Aldrich	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.1
USA	Sigma-Aldrich	2,4-D	.2
USA	Sigma-Aldrich	Acetone	.3
Germany	Merch	Acridine orange	.4
UK	Lab-Chemical	Agar	.5
Korea	Bioneer	Agarose	.6
Germany	Merch	AgNO_3	.7
USA	Sigma Aldrich	Aniline blue	.8
USA	Sigma-Aldrich	BA	.9
Germany	Merch	Beef Extract	.10
Germany	Merch	Biotin	.11
Switzerland	Fluka -	Boric Acid	.12
USA	Sigma Aldrich	Bovine serum Albumin (BSA)	.13
USA	Sigma Aldrich	Bromophenol blue	.14
USA	Sigma-Aldrich	Butanol	.15
Switzerland	Fluka -	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.16
Switzerland	Fluka -	CaCl_2	.17
Switzerland	Fluka -	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.18
Switzerland	Fluka -	CaCO_3	.19
Switzerland	Fluka -	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.20
USA	Sigma Aldrich	Congo red	.21
Switzerland	Fluka -	Crystal violet	.22
Switzerland	Fluka -	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.23
KOREA	BIONEER	Double-distilled sterile water	.24
USA	Sigma Aldrich	Ethidium Bromide	.25
Germany	Merch	Ethyle Alcohoole	.26
Switzerland	Fluka -	Ethylene diaminete reacetie acid (EDTA)	.27
Switzerland	Fluka -	Fe Citrate	.28
Switzerland	Fluka -	Ferric Ammonium Citrate	.29



Switzerland	Fluka -	FeSO ₄ .7H ₂ O	.30
قسم الكيمياء	مختبر الكيمياء الحياتية	Folin reagent	.31
USA	Sigma-Aldrich	GA3	.32
Switzerland	Fluska	Glacial acetic acid	.33
Germany	Merch	Glucose	.34
Germany	Merch	Glucose	.35
Switzerland	Fluska	Glutamine	.36
Germany	Merch	Glycerol	.37
USA	Sigma-Aldrich	Glycine	.38
Iraq	SDI	H ₂ O ₂	.39
USA	Sigma-Aldrich	H ₃ BO ₃	.40
Germany	Merch	HCl	.41
USA	Sigma-Aldrich	IAA	.42
USA	Sigma-Aldrich	Iodine Solution	.43
KOREA	BIONEER	Isopropanol	.44
Switzerland	Fluska	K ₂ HPO ₄	.45
USA	Sigma-Aldrich	K ₂ SO ₄	.46
Germany	Merch	KH ₂ PO ₄	.47
Switzerland	Fluska	KI	.48
USA	Sigma-Aldrich	Kin	.49
Germany	Merch	KNO ₃	.50
Germany	Merch	Lactose	.51
Germany	Merch	Lactose	.52
(Korea)	Bioneer	Laddar	.53
Germany	Merch	L-glutamic acid	.54
	معمل الثروة الحيوانية	Liquid nitrogen	.55
Germany	Merch	Maltose	.56
Germany	Merch	Maltose	.57
Switzerland	Fluska	Mannitol	.58
Germany	Merch	Mannitol	.59
Germany	Merch	Melizitose	.60
Germany	Merch	Melizitose	.61
Switzerland	Fluska	MgSO ₄	.62
Germany	Merch	MgSO ₄ .7H ₂ O	.63
Germany	Merch	MnSO ₄	.64
Switzerland	Fluska	MnSO ₄ .4H ₂ O	.65
Switzerland	Fluska	Myo-Inositol	.66
Germany	Merch	Na ₂ -EDTA	.67
Switzerland	Fluska	Na ₂ HPO ₄	.68
Germany	Merch	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	.69



USA	Sigma-Aldrich	NAA	.70
Switzerland	Fluska	NaCl	.71
Switzerland	Fluska	NaCO ₃	.72
Germany	Merch	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	.73
Germany	Merch	NaMoO ₄ .2H ₂ O	.74
Switzerland	Fluska	NaOCl	.75
Switzerland	Fluska	NaOH	.76
Germany	Merch	(NH ₄) ₂ SO ₄	.77
USA	Sigma-Aldrich	NH ₄ NO ₃	.78
Germany	Merch	Nicotinic Acid	.79
USA	Sigma-Aldrich	ninhydrin	.80
(Canada)	TRC	Nopaline	.81
USA	Sigma-Aldrich	Nutrient broth	.82
(Canada)	TRC	Octopine	.83
KOREA	BIONEER	PCR premix	.84
USA	Sigma-Aldrich	PDA	.85
USA	Sigma-Aldrich	peptone	.86
USA	Sigma-Aldrich	Phenol Red	.87
Germany	Merch	Phrodoxine HCl	.88
KOREA	BIONEER	Primer	.89
USA	Sigma-Aldrich	Proteose Peptone No.3	.90
Switzerland	Fluska	Pyridoxine-HCl	.91
KOREA	BIONEER	RNase APowder	.92
Switzerland	Fluska	Silver Nitrate	.93
Switzerland	Fluska	Sodium citrate	.94
Switzerland	Fluska	Sodium Dodecyl sulfate (SDS)	.95
Switzerland	Fluska	Sodium Potassium Tartarat	.96
Engalnd	BDH	Sucrose	.97
USA	Sigma-Aldrich	TDZ	.98
USA	Sigma-Aldrich	Tetramethyl -P-phenylene diamine dihydrochloride	.99
USA	Sigma-Aldrich	Thiamine-HCL	.100
Germany	Merch	Thiaminic HCl	.101
USA	Sigma-Aldrich	Tric- HCl	.102
Germany	Merch	Tryptone	.103
Germany	Merch	Yeast Extract	.104
Germany	Merch	ZnSO ₄ .7H ₂ O	.105
USA	Sigma-Aldrich	α-Lactose	.106



المضادات الحيوية			
Iraq	SDI	Amoxicillin	.1
Iraq	SDI	Ampicillin	.2
الاردن	الحكمة	Cefotaxime	.3
Germany	Torge-Hamburg	Chloramphenicol	.4
الاردن	الحكمة	Ciprodar	.5
قبرص	Me Dochema	Erthromycin	.6
سوريا	Alfa	Gentamycin	.7
Germany	Torge-Hamburg	Kanamycin	.8
قبرص	Me Dochema	Rifampicin	.9
Germany	Torge-Hamburg	Streptomycin	.10
Iraq	SDI	Tetracycline	.11
Iraq	SDI	Trimthprim	.12

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

تعد العائلة البقولية Poaceae ثلاثة كبرى العوائل التابعة للنباتات الزهرية، وتنقسم الى ثلاث تحت عوائل وهي Papilionoideae و Mimosoideae و Caesalpinioideae (Sprent, 2008).

وتضم هذه العائلة تقريباً 727 جنساً وفيها 1900 نوع نباتي ابتداءً من الاعشاب الى الاشجار الضخمة (معيوف، 1982). وتضم العديد من النباتات المهمة كالجت *Medicago sativa* والبرسيم *Trifolium spp* واللذين يمتازان بغزارة انتاجهما وقيمتها الغذائية العالية، والحلبة *Trigonella foenum-graeum* والحمص *Cicer arietinum L* والبقلاء *Vicia faba* والعدس *Lenus culinaris* وغيرها (Lewis et al., 2005).

ويعد نبات الجت من أهم المحاصيل البقولية العلفية والذي يستخدم كموديلاً بالدراسات الوراثية وهو من النباتات الواسعة الانتشار لوفرة إنتاجه وقيمتها الغذائية العالية وتأقلمه في مختلف البيئات الزراعية ولكونه من النباتات المعمرة فإن لجذوره القابلية على الأمتداد واختراق التربة لمسافات بعيدة قد تصل اطوالها الى (6) اقدم، هذا فضلاً عن قدرته على اقامة علاقة تعايشية مع بكتريا *S.meliloti* ينتج عنها تكوين عقد مثبتة للنتروجين تعمل على زيادة خصوبة التربة وتحسين نوعيتها (Martin et al., 1976). يضم جنس *Medicago* أنواعاً عديدة منها *M. orbicularis* و *M. lupulinal* و *M. minima* و *M. sativa* و *M. falcate* (Crespi & Galvez, 2000)

وتمتاز أفراد هذه العائلة عن بقية العوائل النباتية الأخرى بقدرتها على تكوين علاقة تكافلية بينها وبين بكتريا الرايزوبيوم المستوطنة للتربة ينتج عنها تكوين العقد الجذرية التي تسهم في دورة تثبيت النتروجين (Graham, 2008) باختزالها للنتروجين الجوي الى الامونيا الذي يمثل فيما بعد الى الحامض الاميني Glutamine لتزويد النبات البقولي بالنتروجين القابل للاستعمال (Udvardi & Day, 1997)، وبسبب أهمية النباتات البقولية وفق ما ذكر في الفقرات السابقة، ولغرض تحسينها ورفع محتواها البروتيني، توجهت الدراسات الحديثة الى محاولة تثبيت النتروجين الجوي من خلال التلاعب بالعائل النباتي او البكتريا المثبتة للنتروجين الجوي، ونتيجة لتأثير كل منهما وبشكل رئيس في تأسيس العلاقة التعايشية او بنائها، اذ اشارت احدى الدراسات الى امكانية التلاعب بالعائل البقولي لغرض تحسين النباتات وزيادة كمية النتروجين الجوي المثبت نتيجة لزيادة إعداد العقد (AL-Mallah et al., 1987)، فضلاً عن انتخاب عزلات ذات صفات متميزة في تحملها لمختلف الظروف البيئية وذات كفاءة عالية في تثبيت النتروجين وبأعداد كبيرة وادخالها الى حيز التطبيق والذي كان له دور فعال انعكس بشكل واضح على انتاجية المحاصيل البقولية

وخصوبة التربة، لذا لجأ الباحثون الى استعمال سلالات الرايزوبيوم المهندسة وراثياً والقادرة على تحمل الظروف غير الاعتيادية التي تمكنها من اصابة النباتات وتكوين العقد الجذرية الفعالة في تثبيتها للنتروجين الجوي (Valerie & Sharon, 1999).

وتضم عائلة Rhizabiaceae جنسين مختلفين هما جنس *Rhizobium* المسؤول عن تكوين العقد الجذرية على جذور نباتات العائلة البقولية (Skinner et al., 1977)، وتأتي هذه الإصابة بالرايزوبيوم لعوائلها النباتية وإقامة العلاقات التعايشية نتيجة للتعبير الجيني للجينات المحمولة على بلازميدات التعايش pSym التي تعد من البلازميدات الكبيرة (Schwedock Long & 1992)، وقد قسمت الافراد التابعة لجنس الرايزوبيوم الى مجموعتين بالأعتماد على عدد الأسواط وقابلية نموها على وسط خلاصة الخميرة، وتمتاز المجموعة الأولى: بسرعة نموها على وسط خلاصة الخميرة وبامتلاكها (2-6) أسواط محيطية وتشمل الأنواع الأتية: *R. meliloti* و *R. trifolii* و *R. phaseoli* و *R. leguminosarum*، اما المجموعة الثانية فتضم الأنواع التي تمتاز ببطئ نموها على وسط خلاصة الخميرة، وامتلاكها لسوط قطبي أو تحت قطبي وتشمل *R. japonicum* و *R. lupine*.

والجنس الثاني هو *Agrobacterium spp* (Collins, 2001; Furuya, et al., 2004) ويضم النوع *Agrobacterium tumefaciens* الذي يسبب مرض التدرن التاجي Crown gall (Young et al., 2001) والنوع *Agrobacterium rhizogens* الذي يسبب مرض الجذور الشعرية hairy root disease (Gelvin, 1990) و *Agrobacterium radiobacter* غير ممرض للنباتات (Cubero & Lopez, 2001) وتدخل هذه البكتريا النبات من الجروح الحديثة بالتطعيم والعمليات الزراعية المختلفة، والديدان الخيطية المتطفلة وغيرها، وتعود القدرة الامراضية للبكتريا لامتلاكها بلازميداً كبيراً خارج كروموسومي يطلق عليه Ti-plasmid (البلازميد المحفز للاورام) الذي يمتلك قطعة الـ T-DNA وتنتقل الى الخلية المضيفة (Zaenen et al., 1974) بالية متخصصة تسيطر عليها الجينات الخبيثة onco-genes الواقعة على البلازميد والمتضمنة اكثار T-DNA وتداخله مع المادة الوراثية للنبات المضيف (Nester et al., 1984)، التي حين تستنسخ تسبب تكوين مرض التدرن التاجي على النبات المصاب (Deng & Nester, 1998) علما بان قطعة الـ T-DNA تحتوي على نوعين من الجينات وهي جينات Oncogenic genes التي تشفر لانزيمات تصنيع الاوكسينات والسايوتوكاينيات المسؤولة عن تكوين الاورام، والجينات المسؤولة عن تصنيع مركبات الـ Opines والتي تعبر عن تكوينها بعد تداخل جينات البكتريا مع المادة الوراثية للنبات تستعملها البكتريا كمصدر كاربوني ونتروجيني

لأنها تتكون من أحماض أمينية غير اعتيادية وسكريات مختلفة، أما خارج قطعة الـ T-DNA فتوجد جينات أخرى مسؤولة عن تقويض عمل الـ Opines وعن حدوث حالة الاقتران بين بلازميدات هذه البكتيريا مع أنواع أخرى (Zupan & ; Hooykass & Shilperoort, 1992) (Zambrysky, 1995)

واخذت ميكانيكية انتقال الـ T-DNA حيزاً واسعاً من تركيز الباحثين (Riva et al., 1998) لذلك سخرت هذه الآلية في برامج تحسين النباتات والهندسة الوراثية وذلك لقابليتها على أحداث التحول الوراثي في أي خلية حية ابتداءً من بدائية النواة (Kelly & Kado, 2002) وإلى الخميرة (Piers et al., 1996) والفطريات (Gouka et al., 1999) إلى خلايا الإنسان (Kunik et al., 2001) وفي تطبيقات مختلفة مما جعل من بكتيريا الكرويكتريوم ذات أهمية كبيرة في البحوث الطبية وفي الدراسات المضادة للأورام (Hussain et al., 2007; Ibrahim et al., 2005).

واستعملت كل من بكتيريا *Agrobacterium* و *Agrobacterium tumefaciens* نواقل طبيعية لنقل جينات الـ T-DNA المحمولة على بلازميدات الـ pTi DNA (Hairy root inducing plasmid) Ri-DNA و (Crown tumor inducing plasmid) المسؤولة عن تكوين الأورام التاجية والجذور الشعرية على التوالي في النباتات المصابة (Herrera-Estrella, 2005) وبرز استعمال النوع *Agrobacterium tumefaciens* في أحداث التحول الوراثي في العديد من النباتات مثل التبغ (Block et al., 1984) وفول الصويا (Zhang et al., 1999) والعدس (Samac et al., 2004) والجب (Dogan et al., 2005) والحمص (إبراهيم، 2005) وخف الطير (Nikolic et al., 2007).

وتتضمن آلية الانتقال الأفقي للجينات والتي تحدث ما بين بكتيريا وأخرى لغرض أحداث تغيرات وراثية جديدة على الكائن الحي تتضمن نقل صفة المقاومة للمضادات الحيوية أو المعادن الثقيلة بين الأنواع البكتيرية أو اضعاف صفات جديدة على النبات كصفة مقاومة لمختلف الظروف المناخية ومقاومة المبيدات (Hopkins et al., 1995; Patnaik & Paramjit, 2006) علماً أن هناك ثلاث آليات رئيسة متمثلة بالتحول Transformation والاقتران Conjugation (Liosa et al., 2002; Roberts, 2003) والتوصيل Transduction (Snusted & Simmons, 2000)، وأشارت العديد من الدراسات إلى إمكانية إجراء الاقتران بين البكتيريا السالبة لصبغة كرام ومنها البكتيريا التابعة لعائلة Rhizobiaceae وذلك بنقل قطعة من الـ DNA من الخلية الواهبة Donor cell إلى الخلية المستلمة Recipient cell (Bedmar et al., 1984).

وقد تناولت احدى الدراسات الاختلاف في احجام البلازميدات في الجنسين كليهما، بآلية الترحيل الكهربائي Electrophoresis في هلام الاكاروز (Rosenbery et al., 1983).

وفضلاً عن ذلك فقد شخصت العديد من الدراسات الحديثة باستعمال البصمة الوراثية عن طريق استعمال Polymerase Chain Reaction (PCR) RAPD-PCR مدى التباين الوراثي ما بين الانواع التابعة لهذه العائلة (Procopio et al., 2009). كما استعملت بادئات متخصصة لغرض تشخيص سلالات *Agrobacterium* من نوع Nopaline و Octopine لغرض تضخيم الجينات المسؤولة عن الامراضية مثل Vir B & Vir G (Nesme et al., 1990) فضلاً عن استعمال تقانة تحليل تباين اطوال قطع التقييد Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ليجاد مدى التباين الوراثي ما بين الاجناس.

أهداف الدراسة الحالية

1. عزل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* من الاورام التاجية لنباتات الاس، وبكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنباتات الجت، وتشخيصها بالطرق الزراعية والمظهرية والفحوصات البايوكيميائية والإمراضية.
2. تشخيص *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) على المستوى الجزيئي بتقانة Specific-PCR وبالاعتماد على بادئات متخصصة.
3. التحري عن قابلية الحامض النووي البلازميدي في كل من *Agrobacterium tumefaciens* و *Sinorhizobium meliloti* على الحركة والانتقال من أحدهما للآخر بتقانة الاقتران Conjugation، لدراسة قابلية انتقال صفة كل بكتريا للأخرى على اعتبار أنهما مستوطنات للتربة وامكانية احداث الاقتران بينها أمر وارد جداً.
4. عزل محتوى DNA البلازميدي وتوصيفه في كل من *Agrobacterium tumefaciens* و *Sinorhizobium meliloti* قبل الاقتران وبعده.
5. انتاج نباتات الجت من الاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا *Agrobacterium tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً لسلالة (C58C1) ومن كالسها ومقارنتها مع نظيراتها الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية.
6. التأكد من احتفاظ جينوم انسجة نباتات الجت المحولة وراثياً بجين Rif^{Rest++} وجين *rol B* واثبات تعبيرها الجيني فيها بتقانة PCR.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

1.2 عائلة الـ *Rhizobiaceae*

تضم هذه العائلة جنسين رئيسيين الجنس الأول هو *Agrobacterium* تكون في مرحلة من حياتها ممرضة لنباتات ذوات الفلقتين بالذات، ومن عاريات البذور الى حد ضئيل جداً (Weising & Kahl, 1996)، اما الجنس الثاني هو *Rhizobium* (Balachandar *et al.*, 2007) ، فتقترن الأنواع التابعة له بنظام التثبيت الحيوي للنتروجين الجوي تعايشياً مع النباتات البقولية (Scholte *et al.*, 2002).

2.2 جنس *Agrobacterium*

جنس *Agrobacterium* عبارة عن بكتريا عصوية قصيرة هوائية سالبة لصبغة كرام تستوطن التربة (Furuya *et al.*, 2004)، ذات نهايات مستديرة، عرضها (0.6-1.0 μm) وطولها (1.5-3.0 μm) ، متحركة بأسواط تحت قطبية ، يتراوح عددها ما بين (2-6) أسواط ويصل طولها الى خمسة اضعاف طول البكتريا ، وتتركب الاسواط كيميائياً من Guanine و Cytosine بنسبة 58-62% (Asion, 1988) ، ويضم هذا الجنس أنواعاً عديدة اعتماداً على نوع المرض الذي تسببه على العائل النباتي، وتشمل *A.rhizogenes* الذي يسبب مرض الجذور الشعرية على النباتات من ذوات الفلقتين (Gelvin, 1990) و *A.rubi* الذي يسبب مرض التدرن التاجي على قصب السكر *Rubus* (Kerstens & Deley, 1984) و *A.larrymoorei* الذي يسبب الأورام التاجية على أشجار *Ficus benjamina* (Bouzar *et al.*, 1995) و *A.vitis* الذي يسبب مرض التدرن التاجي على العنب (Berkum Grapes & Eardly, 1998) و *A.radibacter* النوع غير الممرض للنباتات (Delea, 1975)، و بكتريا *A.tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجي Crown gall وهو عبارة عن اورام ذات طبيعة سرطانية وتستمر بالنمو الى ان يصل قطرها الى 25 سم وتتكون على الجذور وعلى التاج والاجزاء الهوائية في عدد كبير من العوائل النباتية يصل إلى اكثر من 800 نوع نباتي (Nester *et al.*, 1984; Canfield & Moore, 1991).

وأطلق عليها الباحثان Smith & Townsend (1907)، *Bacterium tumefaciens* ثم غيره فيما بعد Conn (1942) إلى *A.tumefaciens* ، فضلاً عن وجود أحد عشر نوعاً ثانوياً من هذا الجنس هي : *A.psedotugae*, *A.gypsoghilae*, *A.stellulatum*, *A. ferrugineum*, *A.luteum*, *A.sanguineum*, *A.agile*, *A.gelatinoroums*, *A.kielens*, *A.aggregatum*, *A.polypheroidum*, (Allen & Holding, 1974)

ومن الجدير بالذكر ان هذا الجنس ينقسم الى ثلاثة طرز حيوية Biovar ، ويميز كل نوع منها اعتمادا على العديد من الفحوصات الكيموحيوية والفسيلوجية (Moore et al.,1988) ، وهي : Biovar I ويضم كلاً من *A. radiobacter* و *A. tumefaciens* ، و Biovar II ويضم *A. rhizogenes* ، و Biovar III ويضم *A. vitis* (Ophel & Kerr, 1990).

وتناولت العديد من الدراسات التي أجراها الباحثون موضوع عزل العديد من انواع الاكروبيكتريوم ، فقد عزلت من نباتات زهرة النجمة *Aster spp* الأرجواني Purple flowers (Chen et al ., 1999) ومن الجمبد (Aysan & Sahin, 2003) والتبغ (Furuya et al., 2004) ومن أشجار الخوخ واللوز والأجاص في شمال استراليا (Kerr, 1969) ومن العنب (Bini et al , 2008)، وتشير العديد من الدراسات إلى امكانية عزل *A.tumefaciens* من التربة (Kumar et al., 2013) ومن الأورام التاجية المتكونة على انواع مختلفة من نباتات ذوات الفلقتين التي منها *Artocarpus heterophyllus* و *Terminala arjuna* و *Tectona grands* و *Anthocephalus codomba* و *Solanum lycopersicum* و *Rosa chininsis* (Soriful et al, 2010) .

واعتمد على الصفات المظهرية والفسيلوجية والأختبارات الكيموحيوية والنمو على الأوساط الانتخابية بوصفها قاعدة اساسية للتشخيص، وشخصت البكتيريا المعزولة من التربة على أنها *A.tumefaciens* بالإختبارات الكيموحيوية واختبارات الحساسية للمضادات الحياتية، واختبارات القدرة الأمراضية على تكوين الأورام التاجية على أقراص البطاطا بالمقارنة مع *A.tumefaciens* السلالة (Atcc 23308 T) بوصفه عينة سيطرة، في حين عزل الباحثان Larry & Hacene (1987) ، 126 عزلة بكتيرية من التربة ومن أشجار البلوط Oak المصابة بها وأثبتا بالإختبارات الكيموحيوية وقدرتها على النمو في الأوساط الإنتخابية، في حين استخدم اختبار 3-Ketolactose production للتمييز بين *A.tumefaciens* و *A.radiobacter* (Bernaerts & Deley , 1963) ولتحديد الطراز الحيوي الذي تعود إليه كل بكتريا منهما (Ophel & Kerr, 1990). إذ تم تشخيص 54 عزلة منها تعود لـ *Agrobacterium spp* منها 39 عزلة تعود إلى Biovar II وواحدة تعود إلى Biovar I، أما العزلات الباقية فتعود إلى Biovar III، وفي دراسة اخرى شخصت الأختبارات الكيموحيوية ان البكتريا المعزولة من التربة كانت *A.radiobacter* التي قللت من نسبة تكوين الاورام التاجية على النباتات النامية في هذه التربة وذلك لقدرتها على انتاج Agrocين المثبط لنمو بكتريا *A.tumefaciens* (Jabeen et al., 2009)، وفي هذا السياق تمكن Sarker وآخرون (2011)، من عزل العديد من عزلات بكتيريا *A.tumefaciens* وتشخيصها من نباتات *Mangifera indica* و *Moringa oleifera* و *Tagetes erecta* و *Tagetes Potula*

بالأختبارات الكيموحيوية. ومن جانب آخر تناول العديد من الدراسات الطرق الجزيئية لتشخيص *Agrobacterium*، ومنها تقنية الـ PCR (Polymerase Chain Reaction) وذلك باستعمال بادئات متخصصة لغرض تشخيص سلالات *Agrobacterium* المنتجة لأحماض امينية من نوع Nopaline و Octopine لغرض تضخيم الجينات المسؤولة عن الأمراض مثل Vir B & Vir G ، في حين استعمل الباحثون أنواعاً أخرى من البادئات التي تسمح بتضخيم الجينات المسؤولة عن تشفير Octopine و Nopaline ولا تسمح بتضخيم جينات Agropine وذلك لغرض تشخيص *tmr* gene الواقع على قطعة T-DNA (Nesme *et al.*, 1990) ، في حين استعمل الباحثان Sun و Dong (1992) نوعاً آخر من البادئات لتضخيم جينات VirC2 & VirC1 في سبيل الكشف عن البكتريا الحاملة للبلازميد pTi و pRi ، في حين اشار الباحث Kawaguchi وآخرون (2005) إلى امكانية استعمال تقنية Multiplex PCR لتشخيص سلالات مختلفة من *A.vitis* التي تعود لـ Biovar III المسببة لمرض التدرن التاجي على العنب وذلك باستعمال بادئات متخصصة Specific Primer لبلازميد pTi، اما الباحث Procopio وآخرون (2009) فقد استعملوا تقنية RAPD PCR لتشخيص البكتريا المعزولة من سيقان أشجار اليوكالبتس *Eucalyptus spp* وقد شخص 21% من هذه العزلات على انها تعود لـ *Agrobacterium spp* .

3.2 ميكانيكية اصابة بكتيريا *A.tumefaciens* للنباتات وتكوين الاورام التاجية عليها

تناول العديد من الدراسات جانب التفسير العلمي لخطوات اصابة النباتات وتكوين الأورام التاجية عليها من قبل بكتيريا *A.tumefaciens* (Tzfira & Citovsky, 2002)، وثبت ان البكتريا تدخل النبات من خلال الجروح الحديثة الناشئة عن النيماتودا المتطفلة والتطعيم والعمليات الزراعية المختلفة ، وتظهر أولى دلائل التفاعل بين البكتريا والنبات المضيف بالأرتباط بين الخليتين البكتيرية والنباتية بالانجذاب الكيميائي بينهما بعدد من المركبات الكيميائية التي يفرزها المضيف النباتي وخاصة المركبات الفينولية Acetosyringone و Hydroxy acetosyringone و Ferulic acid و Catechol و Gallic acid و Syringic acid و Sinapinic acid و Resorcylic acid و Pyrogalic acid و Vanillin (Shaw, 1991; Bradley *et al.*, 1997) ، ثم ارتباطها بشكل ضعيف بتصنيعهما بشكل مشترك لمادة الأسيتالديهيد متعدد السكريات متبوعاً بحدوث ارتباط قوي بينهما ناشئ عن إنتاج البكتريا للألياف السليلوزية التي تشفرها الجينات الواقعة على الكروموسوم والتي تعمل على تغليف الجرح النباتي،

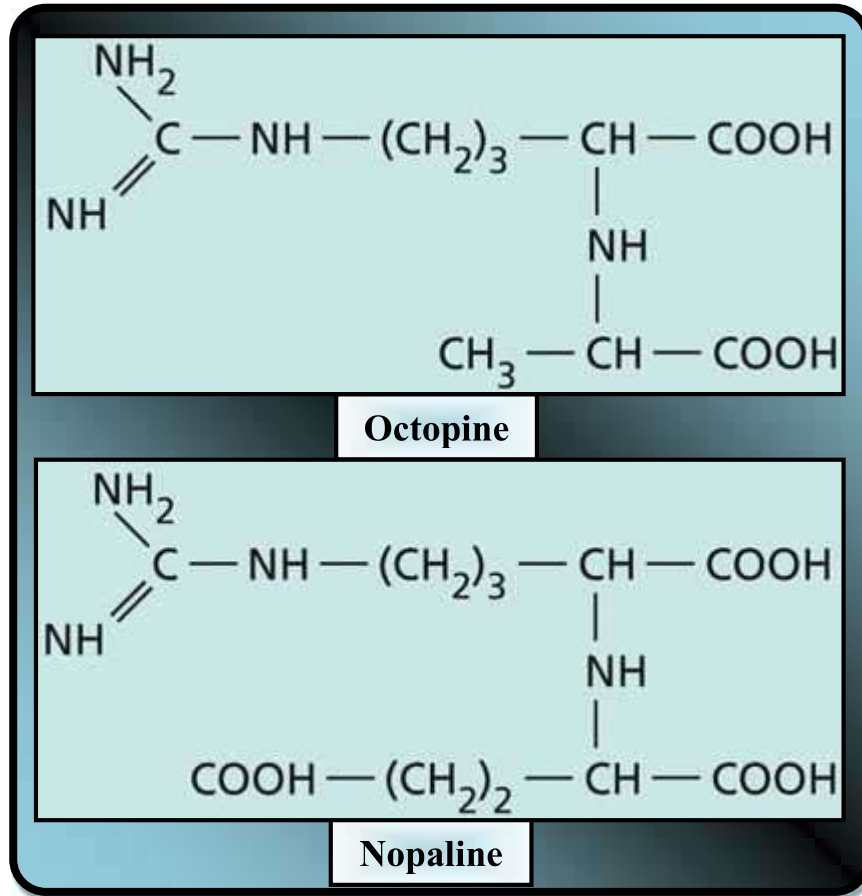
وحال دخول البكتريا تبدأ الجينات الأمراضية Vir genes بالتعبير عن نفسها بشكل متتابع من أجل السيطرة على انتقال قطعة الـ T-DNA من بلازميد البكتريا (Ti-plasmid) إلى نواة خلية العائل النباتي، لتحت حينئذ الخلايا النباتية على الانقسام عشوائياً لتكوين ما يسمى بالاورام التاجية (Gustavo et al., 1998).

4.2 الأساس الجزيئي للتحوّل الوراثي بالأكروبيكتريوم

يتضمن الأساس الجزيئي للتحوّل الوراثي بالأكروبيكتريوم جانبين: أولهما انتقال قطعة T-DNA من بلازميد Ti لبكتريا *A. tumefaciens* إلى الخلية النباتية وتداخلها مع الذخيرة الوراثية للنبات، وثانيهما تغيير العمليات الأيضية داخل الخلية النباتية لإنتاج أحماض أمينية غير اعتيادية يطلق عليها الأوبيينات تستعملها البكتريا مصدراً كربونياً وبتروجينياً، وتساعد على تكوين الورم النباتي (Moore et al., 1997).

وقد أشار Zaenen وآخرون (1974) إلى أن السبب في تكوين مرض الأورام التاجية على النباتات الملقحة ببكتريا *A. tumefaciens* يرجع لامتلاكها جزيئات حلقيّة خارج كروموسومية يطلق عليها (Tumor-inducing plasmid (Ti-plasmid) ويبلغ حجمها الجزيئي أكثر من 200 kbp، (Mysore et al., 2000)، ويحتوي بلازميد Ti على منطقتين مهمتين لاحداث الأمراضية، يطلق على الأولى مجموعة جينات الـ (T-DNA) Transfer-DNA والتي تنتقل إلى الخلية النباتية وتتداخل مع مادتها الوراثية، والثانية هي منطقة Virulence ولها دور كبير في عملية انتقال قطعة T-DNA للنبات المضيف (Deblaere et al., 1985)، وقد برهنت نتائج الدراسات الأولية عن انتقال هذه القطعة (T-DNA) للخلية النباتية، حقائق أو أساساً مهمة تسمح ببناء نظام متكامل للتحوّل الوراثي في النباتات بالأكروبيكتريوم (Torisky et al., 1997)، ويحتوي هذا البلازميد على الجينات المشفرة لبناء أنواع مختلفة من الأوبيينات استعملت لاحقاً في تصنيف بكتريا *A. tumefaciens* إلى عدة مجاميع منها: Octopine [N₂-(1-r)-D-carboxy ethyl)-L-arginine]، الذي يتحول في البكتريا الحاملة لبلازميد من نوع Octopine Ti إلى الأرجنين Arginine وحامض Pyruvic acid، ثم Nopaline [N₂-(1-D-dicarboxy propyl)]، الذي يتحول في البكتريا الحاملة لبلازميد من نوع Nopaline Ti إلى الأرجنين Arginine و 3-Keto glutaric acid، ويتحول بعدها الأرجنين بفعل

أنزيم Argininase الذي تشفره الجينات الى الأورنثين Orinthine الذي يتحول الى البرولين Proline ، فضلا عن Agropine (Cho *et al.*, 1996)، والبكتريا التابعة لهذا النوع من البلازميد تصنع Agropine و Agrocinosines أو احدهما، ويطلق عادة على البلازميد Ti plasmid المصنع للـ Agropine بالـ (Null type) لعدم القدرة على تمييز هذا النوع من الأوبينات داخل انسجة الأورام التاجية (Asion, 1988)، و Octopine و Nopaline (الشكل 1) و Succinamopine و Mannopine / Agropin و Cucumopine / Nopaline / Mannopinesopine / Succinamopine و Mikimopine و Cucumopine (Szegegi *et al.*, 1988; Pionnat *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2001).



الشكل (1): التركيب الكيميائي للاوبينات (Szegegi *et al.*, 1988).

1.4.2 المجاميع الجينية لبلازميدات Ti

تتكون هذه البلازميدات (الشكل 2) من مجموعة من الجينات يمكن اجمالها بالآتي:

1- مجموعة جينات الـ T-DNA

عرفت في بادئ الأمر أنها قطعة من الـ Ti البلازميدي التي لها القابلية على الانتقال الى الخلية النباتية والتداخل مع مادتها الوراثية، وأظهرت دراسات البيولوجي الجزيئي وجود تسلسل من القواعد النتروجينية يصل حجمها إلى 25 bp بشكل متكرر على الضفتين اليمنى واليسرى لهذه القطعة (Yadav *et al.*, 1982; Zambryski *et al.*, 1982)، وأنها تحتوي على نوعين من الجينات وهما:

مجموعة جينات التحول الوراثي يطلق عليها اسم جينات (Oncogenicity genes) Onc- genes وهي المسؤولة عن تكوين مظاهر التحول الوراثي والمتمثلة بتكوين الاورام التاجية من خلال تصنيعها الهرمونات النباتية داخل الخلايا النباتية المصابة، ومجموعة Opine related genes المسؤولة عن تصنيع الأوبيينات التي تستعملها البكتريا مصدراً كاربونياً وبتروجينياً (Hooykass & Shilperoort, 1992; Zupan & Zambryski, 1995) ، و توفر البيئة المناسبة لنمو البكتريا داخل النبات (Guyon *et al.*, 1980).

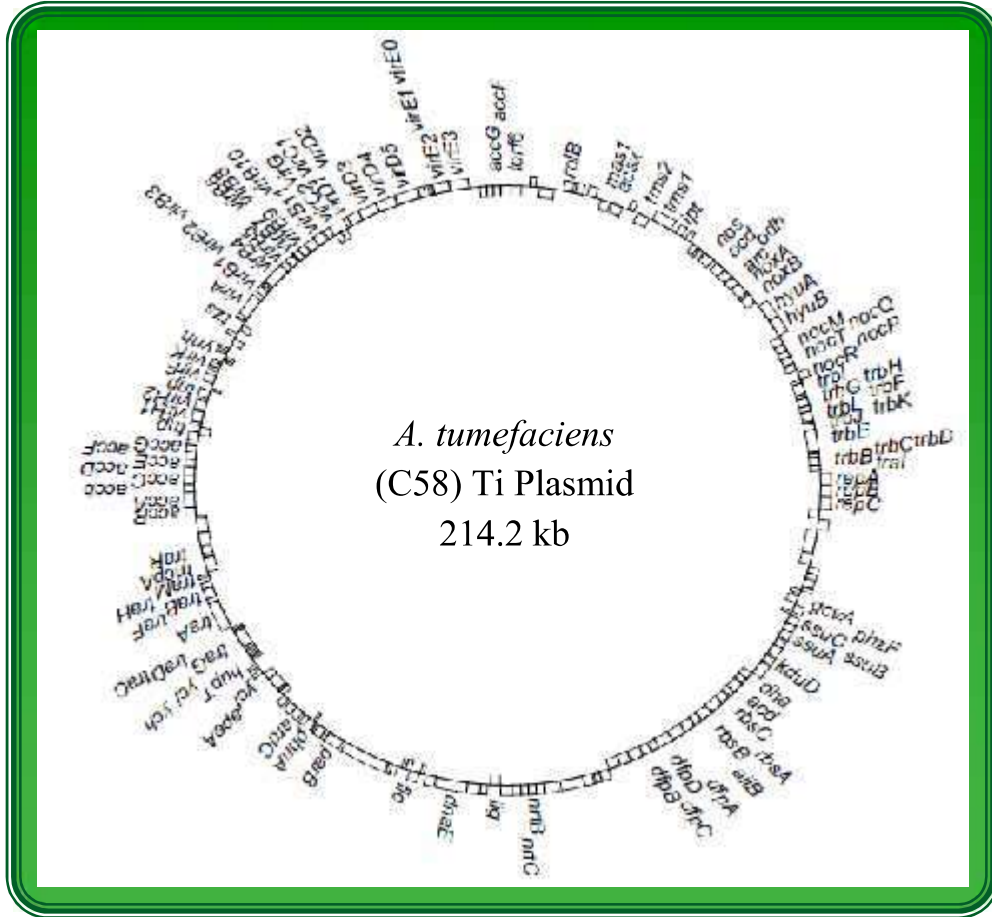
وتشير احدى الدراسات إلى أن قطعة الـ T-DNA في بلازميدات Ti المنتجة للأوبيينات من نوع Octopine و Nopaline تشفر لهما الـ Nos gene و Ocs gene ويمتلكان تسلسلاً بطول 13.5 kbp و 23 kbp يطلق عليه الضفة اليسرى TL-DNA والضفة اليمنى TR-DNA على التعاقب (Zambryski *et al.*, 1982).

2- مجموعة جينات الضراوة Virulence genes ودورها في تكوين الاورام التاجية

تقع هذه الجينات خارج قطعة الـ T-DNA والى يسارها ويرمز لها بـ (*Vir genes*) ويقدر حجمها بحوالي 35 kbp، وتحفز بفعل المركبات الفينولية التي يفرزها النبات وتعمل على نقل قطعة الـ T-DNA الى الخلية النباتية، وقد تبين ان هذه الجينات تكون متكاملة في بلازميد Ti من نوع Octopine أو Nopaline (Maeda *et al.*, 2001)، و تضم Vir A, VirB, Vir C, و Vir D, Vir E, Vir G ، فضلاً عن الجين Vir F في البلازميد من نوع Octopine Ti-

plasmid (Zupan & Zambryski, 1995)، وينظم عمل هذه الجينات الامراضية بشكل معقد للغاية بفعل جينات Vir A/ Vir G ، وقد لوحظ ان حدوث أي طفرة في هذه الجينات سوف يثبط نمو الأورام التاجية (Jin *et al.*, 1990a)، علما ان البروتينات التي تشفرها Vir A, Vir G والبالغ حجمهما 30, 92 kDa على التوالي والواقعة في منطقة الغشاء الداخلي للخلية البكتيرية يعملان نظاماً غشائياً ويقومان بمراقبة الخلايا المجروحة، إذ يتواجد البروتين التي تشفرها Vir A في منطقة الفراغ البيني حول الغشاء البلازمي (Mattysse, Periplasmic (1983)، وتعمل كمستلمات كيميائية حساسة للمركبات الكيميائية التي يفرزها النبات لبدء استنساخ العوامل المنظمة التي تحفز التعبير الجيني Gene expression لبقية الجينات الخبيثة (Jin *et al.*, 1990b)، في حين تقوم بتحديد بروتينات Vir B بتحديد عدد من المواقع في الجدار الخلوي لتسمح بمرور الجزيئات من خلالها، وتسهم بروتينات Vir B/D في حدوث الاقتران وبدء تلامس البكتريا بالخلية النباتية بمستلمات خاصة (Hwang & Gelvin, 2004)، ويحفز الجين Vir A الفسفرة الذاتية للغشاء البلازمي ليعمل على تحويل بروتينات Vir G الى بروتينات مفسفرة (Mattysse, 1983) ويحفز جينات Vir F, Vir E, Vir C, Vir D, Vir B وينشط فعاليتها (Hooykass & Shilperoort, 1992) وهي تحفز الجينات المسؤولة عن استنساخ الشريط المنفرد من الـ T-DNA، وتقص بروتينات Vir D2 شريط الـ T-DNA من الاسفل ويعمل الاخير مع بروتين Vir E2 للارتباط مع SST-DNA في النهاية 5' للانتقال للخلية المجروحة، إذ يغلف Vir E2 شريط الـ T-DNA المقطوع لتكوين المعقد (T-complex) SST-DNA- Vir E2- Vir D2 و يطلق عليه البروتين النووي (Larry *et al.*, 2004)، إذ يمتلك Vir E Operon القدرة على تشفير ثلاثة بروتينات تقوم تغلف السلسلة وتحميها من التحلل بأنزيم Nulcease في سايتوبلازم الخلية النباتية، فضلاً عن ان هذه الجينات تشفر عوامل قابلة للذوبان تساعد على تداخل T-DNA مع الذخيرة الوراثية للنبات (Yusibov *et al.*, 1994) لحدوث حالة التحول الوراثي فيه، وتشارك بروتينات Vir B, Vir D في تكوين تركيب معقد يربط بين الخليتين البكتيرية والنباتية يطلق عليه القناة الافرازية (Jones *et al.*, 1996) لينتقل عبرها البروتين النووي بعد أن يجهز بجزيئات الطاقة ATP, GTP التي يتم ينظم استهلاكها بفعل بروتينات Vir B11 (Hwang and Gelvin, 2004) ، ثم يزال الغلاف المحيط بالمعقد ببروتينات Vir F لبقاء الحامض Vir D2-SST-DNA عارياً (Zupan &

(Zambryski, 1995) وتم استنساخ الشريط المكمل له مكوناً T-Strand DNA، في حين تقص بروتينات Vir D2 الـ DNA الكروموسومي للخلية النباتية ليصبح بتداخل الـ T-DNA مع الذخيرة الوراثية في النهاية 5' الى النهاية 3' للحامض النووي الكروموسومي بآلية معقدة لتكوين rec-DNA (Lehman et al., 1994).



الشكل (2): الخريطة الوراثية لبلازميد Ti Plasmid بكتريا *A. tumefaciens* (C58) (Powell et al., 1988)

3- مجموعة الجينات الكروموسومية الممرضة Chromosomal Virulence Genes

تشير الدراسات الى وجود وحدات وراثية محددة على الكروموسوم مثل chVA، chVB لها دور في حدوث الاصابة وارتباط الاكروبيكتريوم بالخلية النباتية وتداخل المادة الوراثية للبكتريا مع الذخيرة الوراثية للنبات (Melichers et al., 1990)، اذ تسهم جينات chVB في التصاق البكتريا بجدار الخلية النباتية من خلال تكوين الياف السليلوز وتم تكاثر البكتريا داخل الجرح النباتي (Mattysse, 1983).

2.4.2 آلية انتقال قطعة الـ T-DNA الى الخلية النباتية

تتضمن العملية عدة خطوات هي:

1. تكاثر البكتريا على سطح الخلايا النباتية Bacterial Colonization

يعد تكاثر البكتريا المسؤولة عن تحفيز الاورام التاجية أولى اهم الخطوات الضرورية لنجاح ارتباط البكتريا بسطح الخلية النباتية، وأشارت احدى الدراسات الى الدور الذي تلعبه مركبات متعدد السكريات الحامضي (*Matthyse et al*, acidic polysaccharides) (1986) والتي يشفرها الموقع *att* على الكروموسوم المسؤول عن التشفير لبناء المركبات المتخصصة والضرورية لحصول عمليتي التكاثر والتصاق البكتريا بالخلية النباتية والتي تعد أولى الخطوات لحدوث الاصابة (*Matthyse et al.*, 1996; *Higgins et al.*, 1990).

2. تحفيز نظام الأمراض للبكتريا Induction of bacterial virulence system

يحصل انتقال قطعة الـ T-DNA بشكل رئيس من قبل الجينات الواقعة في منطقة - Vir region لبلازميد Ti-plasmid في بكتريا *A.tumefaciens* و يقدر حجمها بـ (30-40) Kbp وتتتركب هذه المنطقة من ستة اوبيرونات (*Vir A*, *Vir B*, *Vir C*, *Vir D*, *Vir E*, *Vir G*) ويختلف عدد الجينات الداخلة في تركيب كل اوبيرون من هذه الاوبيرونات، والاوبيرونا الاكثر اهمية هما (*Vir A*, *Vir G*) اللذان يتحفز تشفيرهما بفعل المركبات الكيميائية الناتجة من الجرح النباتي مثل الفينولات والاسيتوسرنكون (*Winans, 1992*) Acetosyringone والسكريات الاحادية من خلال تضخيم نظام الأستقبال من قبل البكتريا للمستويات الدنيا من الفينولات والسكريات الأحادية (كاللوكوز والكالكتوز) في موقع الجرح النباتي (*Chang & Winans, 1992*). والذي يحفز بدوره عملية استنساخ بقية الجينات الخبيثة (*Vir genes*) (*Cangelosi et al.*, 1990; *Doty et al.* 1996)، وذلك بعد ان يحدث نوع من التعارف بين المركبات التي تفرزها النباتات مع بروتينات *Vir A* الشكل (3) (*Parkinson, 1993; Tzfira & Citovsky.,2006*).

3. توليد شريط الـ T-DNA المعقد Generation of T-DNA transfer complex

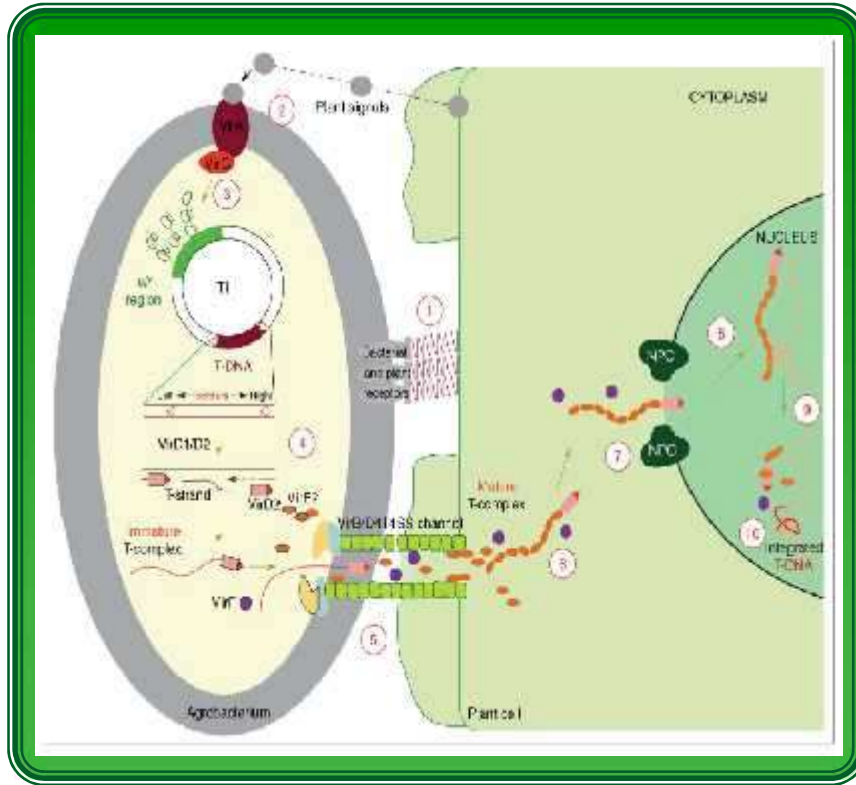
يعمل تنشيط الجينات الخبيثة *Vir genes* على توليد شريط منفرد من DNA وإنتاجه بعد نقل قطعة T-DNA التي يشخص فيها تسلسل القواعد النتروجينية فيها مجموعة من البروتينات (*Vir D1*, *Vir D2*)، واجراء عدد من التحويلات على الجهة اليسرى من منطقة الـ T-DNA المنقولة لتوليد شريط منفرد منها (*Zupan & Zambryski, 1995; Lessl et al.*, 1994)

4. إنتقال قطعة الـ T-DNA transfer T-DNA

تفسر عملية انتقال قطعة الـ T-DNA الى نواة الخلية النباتية بالرجوع الى أغلب الموديولات المقبولة، والتي تتضمن مرورها عبر ثلاثة أغشية هي الجدار الخلوي والغشائي البلازمي والمساحة الخلوية Cellular Spaces، ثم يغلف المعقد المكون من T-DNA Vir D2 ببروتين Vir E2 والذي يبلغ وزنه الجزيئي 9 kbp وذلك لحمايته من التحلل بانزيمات Nucleases، ويمنع تكوين المزدوجات المعقدة وتكوين مواقع لانتقاله خلال أقنية الغشاء البلازمي (Zupan *et al.*, 1996)، ويحتوي هذا البروتين على مؤشرين لتحديد مواقع نووية محددة في جينوم الخلية النباتية يطلق عليها (NLS) Plant nuclear location signals في حين يحتوي الـ Vir D2 على مؤشر واحد (Angle *et al.*, 1998) وهذا يوضح حقيقة الدور المهم لهذه البروتينات في تكوين المعقد الذي يمكن استقطابه من قبل نوية الخلية النباتية (Herrera- Estrella *et al.*, 1990) ووجد ان حذف احد هذه المؤشرات NLS في أي من هذه البروتينات يؤثر في انتقال الـ T-DNA وتداخلها مع الذخيرة الوراثية للنبات لاحداث عملية التحول في الخلية النباتية (Meek *et al.*, 1996).

5. تداخل الـ T-DNA مع الذخيرة الوراثية للنبات Integration of T-DNA in to plant genome

والخطوة اللاحقة هي اوصول هذا المعقد الى المادة الوراثية لنواة الخلية النباتية عبر سايتوبلازم هذه الخلية، ثم يحصل تداخل والتحام قطعة T-DNA مع الذخيرة الوراثية للنبات (الشكل 3) بالية معقدة لتكوين ما يسمى بالقطعة المعاد توليفها rec-DNA (Lehman *et al.*, 1994; Puchta, 1998).



الشكل (3): مخطط عملية التحول الوراثي في النباتات ببكتريا *A.tumefaciens* المستعملة في الدراسة (Tzfira & Citovsky.,2006)

3.4.2 تقانات التحول الوراثي في النباتات

يعني مفهوم التحول الوراثي Genetic transformation في النباتات ادخال قطعة من جزيء DNA واندماجها مع المادة الوراثية للخلية الحية المستقبلية (Estrad-Navarrete *et al.*, 2006)، واعتمدت العديد من التقانات لتنفيذ مختلف بروتوكولات التحول الوراثي في النباتات باستعمال الأروبوكتريوم (Herrera-Estrella, 2005) والفايروسات (Samac *et al.*,2004) والبروتوبلاست (Mariotti *et al.*, 1984) والفذائف البايولوجية (Aragao *et al.*, 2002) والتنقيب الكهربائي Electroporation (Haliloglu *et al.*, 2004) والحقن الدقيق Microinjection (Hansen & Wright, 1999) والأمواج فوق السمعية Ultrasonic waves (Chung *et al.*, 2005).

4.4.2 التحول الوراثي باستعمال الأروبوكتريوم

يعد التحول الوراثي باستعمال الأروبوكتريوم من أهم الموضوعات التي تناولتها البحوث الحديثة وبرامج التنمية النباتية، وذلك بالاستفادة من امتلاك سلالات بكتيريا *A.tumefaciens*

لبلازميد Ti-plasmid المسبب لمرض الاورام التاجية وامتلاك السلالات البكتيرية التابعة لبكتريا *A. rhizogenes* لبلازميد (Ri) Root- inducing plasmed المسبب لمرض الجذور الشعرية ، لاحداث حالة التحول الوراثي في النباتات التي تكمن في اضافة سلسلة الحامض النووي DNA الحامل للجين المرغوب فيها الى قطعة T-DNA يعقبها تحرير هذه الجينات الى الذخيرة الوراثية للخلية النباتية، قد سجلت أولى حالات التحول الوراثي باستعمال *A. tumefaciens* في عام 1980 بتضمين جين المقاومة للكاناميسين في المادة الوراثية لنبات التبغ (Block et al, 1984)، والنباتات المحولة هي بالعادة نباتات خصبة تكتسب جينات جديدة تنتقل الى الأجيال اللاحقة لغرض معالجة مشكلات انخفاض المحصول السنوي ولغرض تحسين النوع النباتي ونتاج نباتات مقاومة لمختلف الظروف المناخية (Fike et al., 2006)، وقد دفعت كل هذه الأسباب الباحثين الى تطوير التقانات الوراثية لتحسين نوعية النباتات، وذلك باستعمال تقانات كفاءة لنقل جزيء DNA إلى المادة الوراثية للنبات ونتاج نباتات محولة وراثياً تحمل صفات متميزة، وانتخاب بروتوكولات خاصة للتحول الوراثي في النباتات، اذ تتحدد مدى كفاءة التحول الوراثي ، بالنمط الوراثي للنبات والجزء النباتي والسلالة البكتيرية المستعملة ووسط الزراعة المستعمل (Opabode, 2006; Hoekema et al., 1993)، لذا كان لابد من تطوير عدد من المتطلبات التي تساهم في انجاح عملية التحول الوراثي بكفاءة عالية، والتي تتمثل باستعمال الخلايا المناسبة كمستقبلات للحامض النووي DNA المنقول، واستعمال الوسائل الكفاءة لنقله الى الخلايا المراد تحويلها وراثياً، ثم ايجاد نظام انتخابي كفاءة للتعرف على الخلايا والنباتات المحولة وراثياً (Herrera-Estrella,2005). ولجأ الباحثون الى استعمال هذه البكتريا اداة للتحول الوراثي في النباتات ولاسيما نباتات ذوات الفلقة الواحدة كما في نباتات الرز Rice والموز Banana والحنطة Wheat التي تمتاز بصعوبة استجابتها للتحول الوراثي، (Ohtas et al., 1994; Cheng et al., 1998; Arencibia et al., 1998).

وتتم عمليات التحول بتحفيز نظام الأمراض Vir system الذي ينقل قطعة T-DNA الى النبات، على الرغم من عدم ضرورة وقوع كل من T-DNA والVir genes على البلازميد نفسه (Hoekema et al., 1993)، مما حفز الباحثين على استغلال جينات Vir genes لاحداث التحول الوراثي دون احداث المرض، وذلك بازالة الجينات المسؤولة عن حدوث

الامراضية وهي Onc genes , وضفتي T-DNA (Torisky et al., 1997) أو ازالة القطع الكبيرة من الجينات غير الأساسية نتيجة لكبر حجم البلازميد إذ يزيد على 200 Kbp في عملية الاستئصال Cloning للناقل أو انشاء نسخ صغيرة منه حاملة للتسلسلات المراد التلاعب بجيناته، باستعمال خلايا *Agrobacterium* او *E.coli* (Jones et al., 1992) ووجد ان من اهم الطرق الكفؤة للحصول على نباتات محولة وراثيا تكمن باستعمال بروتوكولات خاصة بالزراعة النسيجية توفر برنامجا ناجحا للحصول على نباتات متميزة ومحولة وراثياً بالتلاعب بالجينات الخاصة للمضيف النباتي باستعمال الاكروبيكتريوم ، كالتلقيح المباشر للنباتات او اجزائها (قطع السيقان، الاوراق، الجذور) او باستعمال الزراعة المرافقة Cocultivation وذلك بتحصين البكتريا او قطعة DNA الكروموسومي او بلازميد Ti و Ri المعزولة من البكتريا مع الجزء النباتي كالفلق او الأجنة او قطع السيقان (Puddephat et al., 1996; Chkrabarty et al., 2002) ، او كالزراعة المرافقة للاوراق مع الاكروبيكتريوم الناقلة لقطعة T-DNA الى خلايا المضيف النباتي (Chung et al., 2005)، ومع المعلقات الخلوية للكاس (Ditt et al., 2001).

5.4.2 دلائل حدوث التحول الوراثي في الانسجة النباتية

تناول العديد من الدراسات مختلف الطرق للأستدلال على حصول حالة التحولات الوراثية في النباتات (Pupilli et al., 2001) وذلك بملاحظة التغيير الحاصل في مظهر النبات الخارجي، مثل أختزال حجمه وصعوبة تجذيره وتغيير حجم أوراقها (الزهيري، 2002) وتجدها فضلاً عن قلة عدد أفرعها مع أختزال في عدد الأزهار والثمار (صالح، 2002) مع تباين أوقات سقوطها مقارنة بالنباتات غير المحولة وراثياً (Manners & Way, 1989).

بملاحظة التغيير غير الطبيعي في اعداد الكروموسومات ، مقارنة مع أعدادها في النباتات الطبيعية، إذ اشارت الدراسة التي أجرتها الجواني (2004) الى ارتفاع المجموع الكروموسومي لنباتات الباقلاء المحولة وراثياً بالزراعة المرافقة لخلايا المعلق الخلوي مع بلازميد Ri التي بلغ (2n=32) مقارنة بعينة المقارنة (2n=28) للنباتات البذرية. وكشف ايضاً عن التحول الوراثي لكاس اللوبيا المقاوم للكانامايسين والمصنع لـ Nopline (Garcia et al., 1986). وشخصت أربعة أنواع من الأوبيينات Agropine و Mannopine و Cucumopine و Mikimopine المصنعة في الجذور الشعرية المحفزة بفعل سلالات مختلفة من بكتريا *A.rhizogenes* (Sarka et al., 1990).

ويلجأ عدد من الدراسات إلى استعمال تقانة خاصة للكشف عن الجينات المرغوبة وهي طريقة التبقيع Southern blotting وتستند هذه الطريقة الى تكوين بقع لجزيئات الحمض النووي على اغشبة من السليلوز او النايلون، ثم تثبتها على ورقة الترشيح التي تهجن على المسبار (Prob) الملائم والمنشط اشعاعياً و ثم تعريضه الى فلم لاشعة X لتكوين صور الأشعاع الذاتي بشكل حزم سوداء اللون (Southern, 1975)، ومن جانب آخر استعملت تقانة T-DNA analysis لمعرفة التركيب الدقيق للجينات الغريبة ضمن المادة الوراثية للنبات المحول وراثياً، وذلك باستخلاص الـ DNA من النسيج المحول وهضمه بالإنزيمات القاطعة Restriction enzymes وتحديد حجم قطع الـ DNA بهجرتها على هلام الأكاروز باستعمال الدليل الحجمي للـ DNA لامتداد، إذ يمكن رؤية الحامض النووي بشكل حزم بارتفاعية اللون باستعمال صبغة Ethidium-bromide والفحص بالأشعة فوق البنفسجية (Maniatis et al, 1982).

وتعد تقانة التفاعل التضاعفي المتسلسل (Polymerase Chain Reaction (PCR)، من الطرق الأساسية المستعملة في التحليل الوراثي وذلك بإكثار أو تضخيم جزيء واحد من DNA أو نسخة واحدة من الجينات المحدودة والغريبة والكشف عنها بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (Ehrlich & Greenberg, 1992).

استعملت التقانة المذكورة آنفاً للكشف عن حالة التحول الوراثي في نباتات الجت *M. sativa* المحولة ببلازميدات (pchsod,pmitsd) المشفرة جيناته لصفة المقاومة لجهد الأنجماد وذلك باستعمال بادئات متخصصة Specific Primers لتضخيم الجين *neo gene* والكشف عنها بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (Mckersie et al., 1993) وذلك للكشف عن ثباتية التحول الوراثي للنباتات المحولة وراثياً والتمايزة من العقد الفلقية لنباتات *Vigna mungo* المحقونة بالـ *A.tumfaciens* (Saini & Jawal, 2007) وعن التحول الوراثي لنباتات *Vigna unguiculata* الناتجة من الكالس المحول بالاكروبيكتريوم *A.tumfaciens* للسلالة pVCD 2340، الحاملة للجين *npt* (Sahoo et al., 2000)، استعملت تقانة Electroporation لانتخاب نباتات Switch grass المحولة وراثياً باستعمال بكتريا *A.tumfaciens* السلالة EHAlos الحاملة لثلاث جينات (bar gene, Neomycin phosphor transferase, Hygromycin phosph transferase npt) وانتخاب النباتات المقاومة للـ Hygromycin بتضخيم هذه الجينات بـ PCR وتحليلها بهذه التقانة (Song & Southern blot analysis Walworth, 2012) واختبار حالة التحول الوراثي للفرع الخضرية المشتقة من كالس العقد الفلقية المقاوم للـ Glufosinate (Zhang et al., 1999) واستعملت للكشف عن التحول الوراثي في نباتات التبغ المحولة وراثياً والمقاومة للـ Hygromycin، إذ اثبت تحليل Southern bolt analysis داخل قطعة الـ T-DNA للبكتريا مع المادة الوراثية للنبات (Broothaerts ,

2005) والكشف عن التحول الوراثي لنباتات *Artemisia absinthium L* باستعمال *A.tumfaciens* الحاملة للناقل P3SSGUSNT والمقاومة للكاناميسين وال- β glucuronidas بوصفها علائم وراثية لهذه البكتريا (Abdul-Mannan et al., 2009) ويعد استعمال المواد المولدة للصبغات من التقانات المهمة التي تكشف عن التحول الوراثي في النباتات باستعمال مركبات X-gal الذي هو (5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D galactopyrnoside) الذي يتفاعل بالأكسدة مع الأنزيم Beta-glucuronidase الذي يشفره الجين *GUS gene* المحمولة على بكتريا *A.tumfaciens* ليكون المركب Dibromodichloro ذا اللون الأزرق (Jefferson et al., 1987) إذ استعملت هذه التقانة للكشف عن كفاءة سلالة EHA105 للـ *A.tumfaciens* الحاملة للناقل Neomycin phosphor transferase gene في نقل جينات PCAMB1A2301 في *Vigna mungo* (npt11) وال- β glucuronidase (*GUS gene*) الى العقد الفلقية لنبات ، وأظهرت تقانة PCR & *GUS gene* عن حصول حالة التحول الوراثي في اوراق وجذور النباتات المتميزة وانتقال الجين npt11 اليها (Saini & Jawal, 2007) . والى السيقان تحت الفلقية لنباتات *Fraxinus pennsylvanica* والنباتات المتميزة منها (Du & Pijul, 2009) ، وميزت مظاهر التحول الوراثي من تعبير جينات *GUS gene* في نبات القرناييط Cauliflower المحولة والمقاومة لمبيد الأفات بفعل بكتريا *A.tumfaciens* السلالة GV2260 والحاملة للناقل الثنائي P3SSGUSINT (Chakrabart et al., 2002).

6.4.2 التحول الوراثي الحيوي في العائلة البقولية بواسطة الاكروبيكتريوم

استعملت الاكروبيكتريوم لتنفيذ بروتوكولات خاصة بالتحول الوراثي وبكفاءة عالية بوصفها ناقلاً للجينات المرغوب فيها إلى النباتات ومن ضمنها النباتات البقولية (Bean et al., 1997; Brich, 1997). وأشارت العديد من الدراسات الى امكانية الحصول على نباتات بقولية محولة وراثياً لتحسين عدد من صفاتها متضمنة تشجيع اثمارها او تحسين محتواها البروتيني بزيادة قدرتها على تثبيت النتروجين الجوي وذلك بتكوين عقد مثبتة للنتروجين الجوي على الجذور الشعرية لثلاثة أنواع من نباتات الفاصوليا المحولة وراثياً وهي *P.vrularis L* و *P.acutifolius* و *P.coccineus* باستعمال *A.rhizogenes* ، والتلاعب بالمحتوى البروتيني للعائل البقولي ، ، وتراوحت نسبة التحول ما بين 75-90% (Estrad- Navarrete et al., 2006)، كما وطبق بروتوكول التحول الوراثي على نبات البرسيم ونباتات بقولية أخرى كالعدس وفول الصويا والجب و باستعمال *A.rhizogenes* التي نتج عنها تكوين الجذور الشعرية المحولة وراثياً التي كان من أحد تطبيقاتها زيادة عدد العقد وتحسين كفاءتها في تثبيت

النتروجين (Boisson-Derrier *et al.*, 2001)، إذ استعملت *A.rhizogenes* كنمط وراثي لتضمين DNA الى مختلف النباتات كـ *Chickpea* و *Soyabean* و *V.narbonensis* و *Pea* و *Phaseolus aconitifolis* (Christon, 1997) و *V.aconitifolia* و *V.mungo* (Karthikeyan *et al.*, 1996)، فضلاً عن نقل صفة تثبيت النتروجين الجوي الى غير البقوليات كالحنطة والشعير باستعمال بكتريا الرايزوبيوم الطبيعية (البرهاوي، 1999). وذكر الباحث Collier وآخرون (2005) ان مفتاح نجاح عملية التحول في الأنظمة البقولية مثل الجت بوساطة *A. rhizogenes* الحاوية على جينات (*rol genes*) المسؤولة عن تكوين الجذور الشعرية، هو استعمال السلالات الأقل امراضية مثل Arqual & Ksgg بالمقارنة مع السلالات الشديدة الأمراض مثل R1000, MSU4440 (Harrison *et al.*, 2002)، في حين أشارت دراسة أخرى (Dogan *et al.*, 2005) إلى امكانية استعمال مختلف سلالات الاكروبيكتريوم لاجراء عملية التحول الوراثي في نبات العدس *Lens culinaris*، وذلك باستعمال كل من بكتريا *A.tumefaciens* السلالة PBI121.1 (PTiBo 542) A281 الشديدة الأمراض وبكتريا *A.rhizogenes* السلالة (PR15834) 15834 لتحفيز تكوين كل من الأورام التاجية والجذور الشعرية، وذكر ان الضوء كان السبب في تثبيط عملية التجذير للأفرع الخضرية الناشئة من الأورام والجذور الشعرية، وأثبتت تقانات التحليل الوراثي كفاءة السلالتين كليهما في الحصول على نباتات العدس المحولة وراثياً.

ولصعوبة استجابة الانظمة البقولية لاثبات التحول الوراثي فيها فقد استعمل بروتوكول تقانة الزراعة المرافقة Cocultivation الذي مزجت فيه القم النامية لنبات الـ *Chickpea* مع بكتريا *A.tumefaciens* الحامل بلازميدها PCGP 1258 للجين المنظم لصفة المقاومة للمبيد Phosphinothricin (PPT) للحصول على افرع خضرية اكتسبت صفة المقاومة لهذا المبيد، وبلغت نسبة التحول فيها 1.29-3.33% (Rekha *et al.*, 2009)، كما استعملت هذه التقانة لاصابة اوراق نباتات الجت *Medicago sativa* ببكتريا *A.tumefaciens* السلالة LBA 4404 وانتخبت الأفرع الخضرية المحولة وراثياً بنجاح نموها على الوسط الانتخابي الحاوي على الكاربنسولين والتيكارسولين، التي استغرقت عملية تجذيرها تسعة أسابيع (Du *et al.*, 1994)، كما استعملت العقد الفلقية والقمة المرستيمية مع الأكروبيكتريوم لتكوين الأفرع الخضرية المحولة بعد المعاملة (Sonia *et al.*, 2007) والأجنة الجسمية لكالس قطع الأوراق لنباتات *V. unguiculata*، وذلك باستغلال طاقة الأجنة الكاملة لتكوين النباتات المتميزة (Raveendar & Ignacirnuthu, 2010)، لتستعمل مصدراً لتكوين الأفرع الخضرية المحولة التي تمتلك صفات تغيرات جسمية Somaclonal Variation (Jaiwal & Singh,

(2003; Somers et al., 2003). وتناولت إحدى الدراسات نقل جينات المقاومة للكاناماسين وذلك باستعمال هذه التقنية لقطع أوراق نبات اللوبيا *Vigna unguiculata* مع سلالة البكتريا *A. tumefaciens* الحاملة للجين المقاوم للكاناماسين، وقد انتخب الكالس المقاوم على الأوساط الانتخابية الحاوية على تراكيز متباينة من المضاد الحيوي، وأظهرت الدراسة صعوبة تمايز هذا الكالس إلى الأفرع الخضرية على الرغم من إثبات حالة التحول الوراثي بالطرق الوراثية (Garcia et al., 1986). في حين تناولت دراسة أخرى عملية التحول الوراثي لنبات فول الصويا *Soybean* وباستعمال قطع العقد الفلقية *Cotyledonray node* نظاماً للتحول الوراثي ببكتريا الاكروبيكتريوم الحاملة لجين المقاومة *bar gene* باستعمال تقنية الزراعة المرافقة *Cocultivation* لمدة 3 أيام، ونقلت الأجزاء النباتية إلى وسط B5 المدعم بمنظم النمو BAP وتراكيز متباينة من *Glufosinate* وأظهر الكالس والنباتات المتميزة لمقاومة أعلى لهذا المبيد عند التركيز 5 ملغم/لتر، ونجحت النباتات المتميزة في الأقلمة والنمو في تربة الحقل (Zhang et al., 1999).

واستعملت دراسة أخرى الدلائل الكيميائية النسيجية للتعبير عن الجين *GUS* في النباتات المفترض تحولها وراثياً، باستعمال الأجزاء الخضرية الفتية المجروحة مع بكتريا *A. tumefaciens* الحاملة لعينات المقاومة للكاناماسين، وبلغت أعلى نسبة تعبير لجينات *GUS* 80% حين استعمال الأوراق النباتية، و 60% مع السيقان تحت الفلقية، و 40% حين استعمال الجذور جزءاً نباتياً للمعاملة أما الكالس المحول فقد انتج على أوساط انتخابية حاوية على تراكيز تصاعدية من *Kan* ووصلت نسبة المقاومة فيه إلى 800 ملغم/لتر (Tazeen & Mirza, 2004). واستعملت الأكروبيكتريوم أداةً للتحول الوراثي في نباتات البرسيم الأحمر *Trifolium pratens* بوصفها موديلاً متطوراً للحصول على نباتات متميزة ومحولة وراثياً ولمختلف الأنماط الوراثية من الأجنة الجسمية المتميزة على الكالس المشتق من الزراعة المرافقة للأجزاء النباتية مع البكتريا، التي نجحت عملية تجذيرها وأقلمتها ونقلها إلى التربة، وتراوحت نسبة النباتات المقاومة للكاناماسين ما بين 20-70% في حي بلغت نسبة التحول الوراثي بالفحص الكيميائي النسيجي للتعبير عن الجين *GUS* في النباتات المفترض تحولها وراثياً 10% (Sullivan et al., 2004) وذكرت إحدى الدراسات (Ninkovic et al., 2004) حدوث التحول الوراثي في نباتات الجب *Medicago sativa* المعاملة مع السلالة *A. tumefaciens* (LBA 4404) الحاملة لبلازميد PTOK233 الحامل لجين المقاومة *hpt gene* *hygromycin resistance* بوصفه مؤشراً إنتخابياً و *GUS uida* جيناً مخبراً *reporter gene* حدوث حالة التحول الوراثي في النباتات الناتجة بنسبة 14% والتي أظهرت مقاومة

للمضاد الحيوي Hygromycin. ونجحت دراسات أخرى في إنتاج نباتات فول الصويا محول وراثياً تحمل صفة المقاومة للمبيدات (Padgett et al., 1995)، وإنتاج نباتات فول الصويا مقاومة للفايروسات (Dir et al., 1996) ومقاومة للآفات (Stewart et al. 1996)

ونجح الباحث Mariotti وآخرون (1984) في تكوين الأورام التاجية على بادرات الجت الملقحة بالتركيز الواطئة من لقاح *A.tumefaciens* السلالة AcHs، وابدت الأنسجة الملقحة صعوبة بالتمايز بالمقارنة مع تمايز الأنسجة للبادرات غير الملقحة (معاملة المقارنة). في حين حققت إحدى الدراسات نجاحاً كبيراً في إنتاج بقوليات محولة وراثياً من نباتات الجت *M.truncutula* في مدة قياسية بالتلقيح المباشر للبادرات بسلالتين من بكتريا *A.rhizogenes* MSV440, R1000 وقد باشرت بتكوين الجذور الشعرية المحولة وراثياً والتي امتازت بقابليتها العالية على تكوين العقد الجذرية المثبتة للنتروجين الجوي وبناء علاقة تعايشية مع المايكورايزا، ومقاومة هذه النباتات للأمراض الفطرية والنيماتودا (Boisson-Derrier et al., 2001)، على العكس من استعمال بكتريا *A.tumefaciens* التي يستلزم معها الحصول على نباتات جت *M.truncutula* محولة وراثياً مدة لا تقل أو تتراوح ما بين 4-6 أسابيع، وأشار Samac وآخرون (2004) الى إنتاج نباتات جت *M.sativa* محولة وراثياً وبمدة تراوحت ما بين (3-4) أشهر من معاملة الأوراق ببكتريا *A.tumefaciens* متبوعة بتحفيز تكوين الأجنة الجسمية من الكالس، والتي تتطور الى نباتات كاملة تحمل صفات مقاومة للأمراض.

واستعملت البكتريا (A281) الـ *A.tumefaciens* و (PRG15834) الـ *A.rhizogenes* لدراسة تأثيرها في اربعة أنماط وراثية من العدس، وأشارت الدراسة الى نجاح هذه السلالات في تحفيز تكوين الأورام والجذور الشعرية على النباتات المحقونة، وقارنت الدراسة المارة كفاءة كل من السلالتين في إجراء التحول الوراثي لهذا النبات (Petit et al., 1983; Hood et al., 1986) ، وبرهنت إحدى الدراسات التي استعملت ثلاث سلالات بكتيرية لـ *A.tumefaciens* الحاملة لبلازميد PTiB0542 والسلالة البرية (B653) والسلالات (Gv3101) و (GV2255) و (PGV2215) و (PGV2235) و (PGV2255) و (PARA4b) و (C58C1) استجابة جميع الأصناف لتكوين الأورام التاجية واستحداث الكالس المحول وراثياً على الرغم من التفاوت في قابلية هذه الأصناف لتكوين الأورام. (Jelenic et al., 2000).

ونجحت دراسات اخرى في انتاج نباتات كاملة من مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً نتيجة لحقن نبات برسيم خف الطير *L.corniculatus* ببكتريا *A.rhizogenes* (Petit et al., 1987) والبرسيم *T.repenes* (Diaz et al., 1989) ونبات *Vicia hirsute* (Quandt et al., 1993) و *Lijaponicus* (Stiller et al., 1997) و *T.pratense* (Diaz et al., 2000) و *Lens culinaris* (Khawar et al., 2001) و *M.truncatula* (Boisson-Dernier et al., 2001)، واستعملت الأوراق الفلقية لنبات خف الطير *Lotus corniculatus* لتكون مصدراً لتمايز أعداد كبيرة من الأفرع الخضرية المحولة وراثياً نتيجة المعاملة بسلالة البكتريا *A.tumefaciens* LBA 4404 الحاوية على البلازميد PTOK 233 الحامل لجين *uidA* وجين *hpt* و *nptII* بوصفها علائم وراثية، وحصل على الأفرع الخضرية بعد الزراعة على وسط التمايز بخمسة أشهر وكشف عن انتقال جين المقاومة الى الأفرع المتميزة للمضاد الحيوي Hygromycin بعد عزل DNA وتضخيمه بتقانة PCR والتسلسل الجيني الذي أثبت وجود التسلسل الجيني للـ *uid A gene* أيضاً، وتعزز نجاح العملية بنقل النباتات الى البيت الزجاجي وتكوينها للأزهار والبذور (Nikolic et al., 2007).

5.2 جنس *Rhizobium*

أشار Sprent (2001) الى أن أفراد هذا الجنس تمتاز بكونها خلايا عسوية سالبة لصبغة كرام، تستوطن التربة، هوائية، تمتلك طبقة دهنية خارج الغشاء، تتألف من الخارج من LipopolySaccharides ومن الداخل من Phospholipids، وتمتاز بكونها حرة المعيشة ومتحركة وعسوية (Jordan, 1984) أبعادها $(0.5-0.9 \times 1.2-3 \mu m)$ ، وتحتوي على حبيبات $Poly-\beta$ -hydroxybutyrate، غير مكونة للسبورات، متحركة بأسواط قطبية أو تحت قطبية موجودة بصورة منفردة أو مزدوجة، وتنمو على الأوساط الغذائية الحاوية على الخميرة، وعلى سكر المانيتول أو الكلوكوز بهيئة مستعمرات شفافة لزجة، ويتراوح مدى درجات الحرارة لنموها بين $(25-30)^\circ C$ والذالة الحامضية (pH) بين $(5-8.5)$ ، ولا تنتج الغاز، تستعمل أملاح الأمونيوم والنترات ومعظم الأحماض الأمينية مصدراً للنيتروجين، وتستعمل الكازيين Casien مصدراً للطاقة، ويحتاج عدد من سلالاتها الى الفيتامينات الذائبة في الماء لنموها (Vincent, 1974).

ويضم هذا الجنس الأنواع البكتيرية المعروفة بقابليتها على تكوين العلاقة التعايشية مع البقوليات لتكوين العقد الجذرية التي يثبت فيها النيتروجين الجوي الى الأمونيا، فضلاً عن تخصص كل نوع من أنواعها لاصابة نوع نباتي معين من نباتات العائلة البقولية

(Balachandar et al., 2007). وذلك لارتباط الانواع البكتيرية التابعة لهذا الجنس بمستوى عالٍ من التنوع الوراثي والمظهري (Pinero et al., 1988)، ويرجع هذا التنوع لاختلاف المضيف النباتي الذي يتمكن فيه النوع البكتيري من تكوين العقد على مجموعته الجذري بعلاقة تعايشية على درجة عالية من التخصص (Graham, 2008) أو قد يرجع لاختلاف الموقع الجغرافي للعزلة البكتيري او شدة قابليتها على اصابة المضيف النباتي أو لاختلاف الظروف البيئية أو لنوع التربة (Eardly et al., 1995).

1.5.2 تصنيف بكتريا الرايزوبيوم

تصنف الرايزوبيا إلى إثني عشر جنساً تضم 57 نوعاً متضمنة أنماط حياتية Biovar مختلفة (Weir, 2006)، وعلى الرغم من تصنيف معظم أنواعها تحت مجموعة-α Protobacteria، تضم الأجناس الآتية *Azorhizobium* و *Ochrobacterium* و *Methulobacterium* و *Bradyrhizobium* و *Sinorhizobium* و *Rhizobium* و *Mesorhizobium* (Trujillo et al., 2005) و *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005). فإنه توجد أنواع أخرى تمتلك القدرة على تكوين العقد الجذرية تنضم تحت مجموعة-β Protobacteria (Moulin et al., 2001)، التي تشمل الاجناس الآتية: *Bulkholderia* (Chen et al., 2007) و *Curiavidus* (Chen et al., 2001) و *Rivas et Devoisa* (al., 2003).

وصنفت الى مجموعتين بالاعتماد على سرعة نموها على الوسط الغذائي:

مجموعة الرايزوبيوم البطيئة النمو *Slow growing Rhizobium* وتشمل أفراد جنس *Bradyrhizobium* والذي يتميز ببطئ نموه على الأوساط الغذائية، إذ تتراوح المدة اللازمة لنموها 6-8 ساعات (Balachandar et al., 2007) وتضم الأنواع الآتية: *B. Parasponia* التي تتخصص بإصابة الأشجار الأستوائية العائدة لعائلة *Ulmaceae* (Trinick, 1973)، و *B. Lupini* التي تتخصص بإصابة نباتات اللوبيا *Cowpea* وتكوين العقد الجذرية على جذورها.

ومجموعة الرايزوبيوم السريعة النمو *Fast growing Rhizobium* التي تتميز بسرعة نموها على الأوساط الغذائية، إذ تتراوح المدة اللازمة لنموها 2-4 ساعات وتشمل أفراد جنس *Rhizobium* (Arrese et al., 1993) وتضم الأنواع الآتية: *R.leguminosarum biovar phaseoli* التي تتخصص بإصابة نباتات الفاصوليا، و *R.leguminosarum biovar trifoli* وتتخصص بإصابة نباتات البرسيم، و *R.leguminosarum* وتتخصص بإصابة نباتات الباقلاء

والعدس او الحمص (Jordan, 1984)، و *R.meliloti* التي تتخصص بإصابة العقد وتكوينها على جذور نباتات الجت (Catoira et al., 2001)، علماً ان هذه البكتريا قد غير اسمها الى *Sinorhizobium meliloti* من قبل (Strteit et al., 2004) ومؤخراً الى *Ensifer meliloti*.

وصنفت الى مجموعتين وذلك بالأعتماد على التركيب الكيماوي لنوع الدهن N-acylation المتواجد في عوامل تكوين العقد (NFs) Nodulation Factors (NFs) ، المجموعة الأولى: وتشمل *Rhizobium loti* و *Azorhizobium caulinodaus* و *Rhizobium sp NGR234* و *Bradyrhizobium japonicum* و *Rhizobium fredii* التي تنتج عوامل تكوين العقد الحاوية على الأحماض الدهنية التابعة لايبض الدهون العامة مثل (Raccenie acid) المكونة للعقد الجذرية على البقوليات في المناطق الأستوائية (Cohn et al., 1998) والبقوليات التي تقطن المناطق المتوسطة وعالية درجات الحرارة. والمجموعة الثانية: وتشمل *Sinorhizobium meliloti* (Lerouge et al., 1990) و *Mesorhizobium R.leguminosarum bv. trifolii* (Vander et al., 1996) و *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* و *huakuii* (Spaink et al., 1991) المكونة للأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة Poly unsaturated fatty acid وهي المكونة للعقد الجذرية على جذور النباتات البقولية العشبية المستوطنة للمناطق المعتدلة.

2.5.2 التقانات المستعملة في تشخيص بكتريا الرايزوبيا

استعملت عدة تقانات لتميز بكتريا الرايزوبيا وتشخيصها لكونها تمتلك ضروب عديدة، واستطاع الباحثان Erums و Bano (2008) عزل عدة عزلات لبكتريا الرايزوبيوم من مناطق جغرافية مختلفة من شمال باكستان وتشخيصها بالمظهر الخارجي لمستعمراتها والفحوصات الكيموحيوية، وفحوصات الكشف عن مستويات الهرمونات النباتية (Zeatin, IAA, GA) التي تنتجها هذه البكتريا في نباتات فول الصويا Soybean، وعد التشخيص بالمظهر الخارجي اقل دقة مقارنة بالتقانات الجزيئية (Thies et al., 2001)، وأحد أهم هذه الطرائق هو استعمال تقانة التفاعل التسلسلي البوليمري Polymerase chain reaction (PCR) لتضخيم الـ DNA لتحديد البصمة الوراثية لكل عزلة بكتيرية (Graham, 2008). ومنها مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (Random Amplified Polymorphic DNA) RAPD

(DNA) ، وباستعمال هذه البادئات ذات تتابع عشوائي تحتوي على الأقل على 50% من القاعدتين (G+C)، والتي كشف عنها بالترحيل على هلام الأكاروز وصبغ الهلام فيما بعد بصبغة Ethidium bromide وذلك لقدرتها على الارتباط بجزيئة الـ DNA المتضاعفة بشكل حزم متباينة الأطوال (Welsh & Mclelland, 1991)، وظهور هذه الحزم أو اختفاؤها ناتج عن التباينات بين الأفراد التي يكون سببها الأتحادات الجديدة Recombination أو نتيجة لحدوث الطفرات Mutation بوصفها طفرات الحذف Deletion أو الأضافة Insertion (Bardakci, 2001). وعند تطبيق تقانة الـ RAPD للتمييز بين تسع عشرة عزلة من الرايزوبيا المعزولة من نباتات الجت المستوطنة للمملكة العربية السعودية، أظهرت نتائج الدراسة وجود التنوع الأحيائي الكبير بين العزلات (الأسمرى، 2007).

واستعملت الانزيمات القاطعة لتطبيق تقانة Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) لقطع اماكن محدودة من الـ DNA ثم تضخيمها بتقانة PCR وتحليلها وراثيا (Kishinevsky et al., 1996; Odee et al., 2002).

وتناولت احدى الدراسات (Zohary & Heller, 1984) التشخيص السريع لبكتريا الرايزوبيوم باستعمال تحليل تباين اطوال قطع التقييد (RFLP) لنواتج الـ PCR المضخمة لجينات الـ nod A لظهار التباين بين مختلف عزلات *T.ambiguum* & *T.repens*، واستعملت تقانة الـ PCR للتضخيم والكشف عن جينات الـ 16S rRNA لتشخيص الرايزوبيوم وللكشف عن فعالية الجينات المشفرة لانزيمات النتروجينيز وأنزيم Glutamine synthesis (Jensen et al., 1993) ، وكذلك تشخيص مواقع عدد من الجينات الخاصة بالعلاقة التعايشية في سلالتين من السلالات البرية لبكتريا *R.l.bv trifoli* (Schlaman et al., 2006).

3.5.2 ميكانيكية إصابة النباتات البقولية ببكتريا الرايزوبيا وتفسيراتها الوراثية

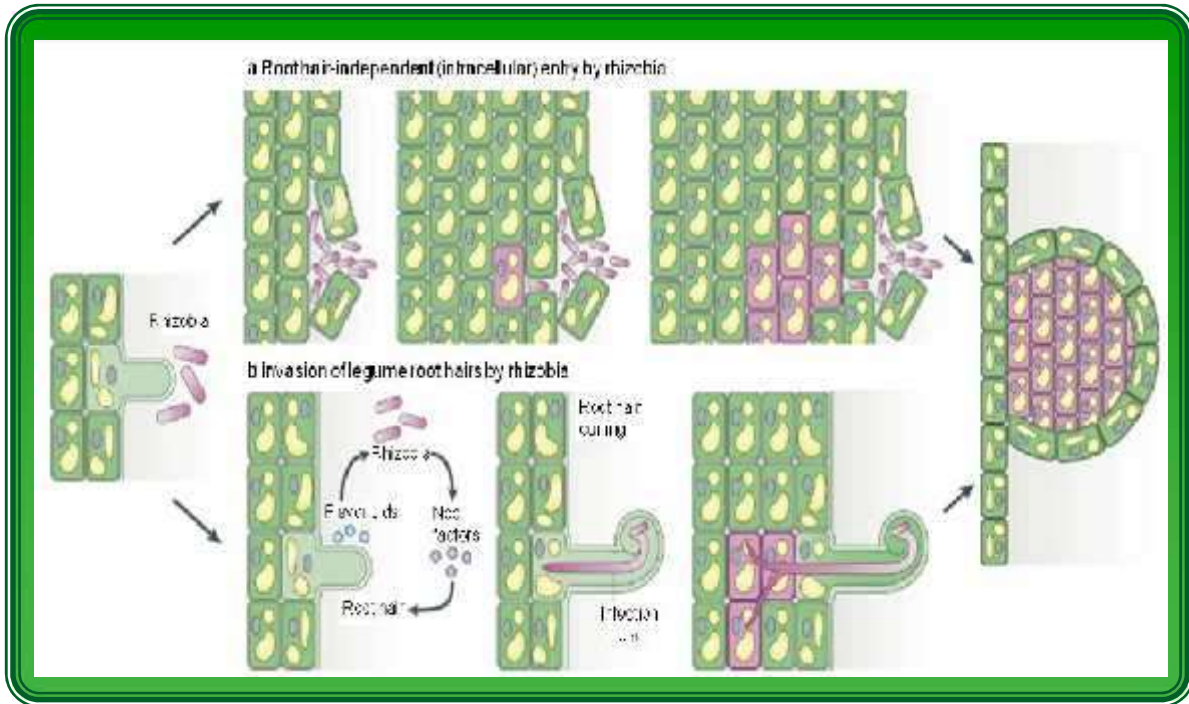
تتميز نباتات العائلة البقولية Leguminaceae ببناء علاقة تعايشية مع بكتريا الرايزوبيوم *Rhizobium* المتكاثرة حول مجموعها الجذري، وينتج عن هذه العلاقة تكوين أعضاء خاصة يطلق عليها العقد وتتكون على الجذور وتتم في داخلها عملية اختزال النتروجين الجوي N_2 إلى الأمونيا NH_3 ليستعمله النبات في بناء السكريات والحوامض الأمينية (Soltis et al., 2002). وتبدأ هذه العلاقة بأسهام المجموع الجذري في العائل البقولي في افراز عدد من المركبات الخلوية التي تشجع على تجمع وتكاثر بكتريا الرايزوبيا في منطقة الرايزوسفير *Rhizosphere* وهي المنطقة المحيطة بالجذور، وهذه المركبات تتمثل بالكربوهيدرات والأحماض العضوية والأمينية والأنزيمات والفيثأمينات وتفرز الشعيرات الجذرية مركبات أخرى *Flavonoids, Eitherflavons, Flavons* التي منها مركبات *luteolin* الذي تفرزه نباتات

الجت و Tetrahydroxy flavones الذي تفرزه نباتات فول الصويا *Glycine max* الى التربة المحيطة بالجذور لتعمل كعامل جذب كيميائي ليحفز على ارتباط البكتريا بالشعيرات الجذرية للنبات، وتتباين الكمية التي يفرزها النبات من نبات إلى آخر وتعتمد على عمر النبات والحالة الفسيولوجية له، ولنوع المركب الذي تفرزه الجذور النباتية دور تخصصي في توجيه البكتريا باتجاه المضيف النباتي (Spaink, 2000) وفي افراز عدد من الدلائل الجزيئية من قبل الشعيرات الجذرية بفعل مستقبلات خاصة من قبل البكتريا يطلق عليها بروتينات *nod D* التي تشفر بروتينات تنشط عمل الأوبيرون الخاص بتكوين العقد (Manunory *et al.*, 2008) وهذا التفاعل يحفز الجينات المنتجة لعوامل تكوين العقد Lipo-Chitine Nod factors oligosacharidcs (LCOS) او (Breedveld *et al.*, Lipo-Poly sacharids (LPS) (1993) لبدء الأحداث المبكرة للعلاقة التعايشية (Manunory *et al.*, 2008) ، لترتبط البكتريا به مع (Lectin) النبات الذي تفرزه الشعيرات الجذرية الفتية، ويعتقد أن لحركة الرايزوبيوم بالأسواط أثراً كبيراً في دعم تكوين العقد ونجاحه لأنها توجه البكتريا باتجاه المحفزات الكيميائية التي تفرزها الشعيرات الجذرية، وثم الظفر بالشعيرة الجذرية والأرتباط بها (Bergman *et al.*, 1988)، إذ أظهرت إحدى الدراسات الأخفاق في تكوين العقد حين استعمال بكتريا الرايزوبيوم الطافرة غير المتحركة (Dilworth *et al.*, 2000) وأن افراز الشعيرات الجذرية للمركبات الكيميائية الايجابية والمتوافقة مع البكتريا المتخصصة يسرع من حدوث عملية الاصابة (Caetano-Anolles *et al.*, 1998) ، ويسهم بشكل فعال في المنافسة بين الأنواع البكتيرية لجنس الرايزوبيوم في تكوين العقدة (Glash *et al.*, 1984)، وبعد التصاق البكتريا بالشعيرات الجذرية تتحول من الشكل المستقيم الى الشكل المشوه مثل الشكل المعروف بخطاف الراعي (Wood & Newcomb, 1989) أو بشكل متفرع أو بشكل حلزوني ملتوي (الشكل 4) ويعزى السبب في ذلك الى عوامل تكوين العقد (LPS) التي تفرزها بكتريا الرايزوبيا (Xie *et al.*, 1995; Bakkou, 2011) ، وتشير الدراسات إلى ان الغرض من هذا التشوه هو زيادة المساحة السطحية لامتناس المغذيات من التربة، وان هذا الألتفاف يبدو تركيبياً موضعياً للشعيرة الجذرية يشكل نقطة البدء لتكوين خيط الاصابة Infection threads (Lhuissier *et al.*, 2001) ثم يفرز النبات انزيم Polygalctouronase (Fahraeus & Ljunggren, 1959) في حين تفرز البكتريا انزيمات Hemicellulase, Pectinase (Martinez-Molina, 1979) اللذين يعملان معاً على هضم الجدار الخلوي لقمة خلية الشعيرة الجذرية لتكوين تركيب انبوبي الشكل يسمى بخيط الاصابة و اجراء تحويرات في الغشاء البلازمي (Ridge & Rolfe, 1985)، ويبدأ خيط الاصابة بالنمو والتفرع داخل خلايا القشرة، وتتحرك البكتريا الى سايتوبلازم خلايا القشرة المصابة بعملية يطلق عليها الادخال الخلوي endocytosis لتحيط نفسها بغشاء مشتق من

الأغشية النباتية يطلق عليه Peribacteroid membranes ، (Vasse et al., 1990)،
 وحينئذ تحفز عوامل تكوين العقد على انقسام خلايا القشرة نتيجة لاختلال التوازن الهرموني بين
 نسبة الأوكسين الى الساييتوكاينين مع تركيز ايونات الكالسيوم داخل هذه الخلايا، ثم يحصل غلق
 موضعي يمنع انتقال الأوكسين بفعل الفلافونيد المتجمع بتأثير البكتريا (Debilly et al.,
 2001) ويحصل هذا الانقسام أما في خلايا القشرة الخارجية وتسمى حينئذ بالعقد المحدودة النمو
 Determinate nodules كما في العقد الجذرية المتكونة على نباتات فول الصويا *Glycine*
max والعدس *Lotus Japonicus* (Rolfe & Gresshoff, 1988) التي تتلاشى بسرعة
 وتكون مدة حياتها قصيرة (عدة أسابيع) أو في خلايا القشرة الداخلية لتكوين العقد غير المحدودة
 النمو Indeterminate nodules مثل تلك العقد المتكونة على جذور الجت *Medicago*
sativa والبرسيم *Trifolium repens* و البازلاء *Pisum sativa* (Hirsch, 1992) نتيجة
 لاصابة هذه النباتات ببكتريا *S.meliloti* و *R.leguminosarum* bv.*trifolii* و
R.leguminosarum bv.*Vicia* (Pueppke & Broughton, 1999)، وتتكاثر البكتريا
 بسرعة كبيرة وتتميز داخل العقد الجذرية الى ما يعرف بالبكتريود (Brewine,
 Bacteriods 1998) المسؤولة عن اختزال النتروجين الجوي الى الامونيا.

ثم تنقل الامونيا الناتجة الى سايتوبلازم النبات العائل لتشارك في بناء مختلف البروتينات
 والأحماض النووية التي يحتاجها النبات، وتعد وحدات ATP إحدى أهم المتطلبات الضرورية
 لاختزال النتروجين في حين يعد أنزيم النتروجينز من المتطلبات الرئيسية لعملية تثبيت النتروجين
 تعيشياً، وتشفره جينات *gene (NIF) Nitrogen fixation gene*، البالغ عددها 15-20
 (Fischer, 1994)، علماً أن هذا الانزيم يتكون من معقدين ولا يكون احد المعقدين فعالاً بغياب
 الآخر، وهما المعقد Fe-protein الذي يتكون من وحدتين متماثلتين ولا يحتوي على الموليبيديوم،
 والمعقد الثاني Mo-Fe-Protein، ويحتوي كل من المعقدين على الكبريت بأعداد مماثلة لاعداد
 ذرات الحديد Mo-Fe-Protein (Gubler & Hennecke, 1988)، أن من أهم مميزات هذا
 الأنزيم حساسيته العالية للاوكسجين لذا يحميه مركب خاص يدعى Leghemoglobin ويعمل
 على نقل O_2 الى سلسلة نقل الالكترن وبذلك يجعل من العقدة السليمة ذات كفاءة عالية في
 تثبيت النتروجين (Appleby, 1984) ويشترك في تكوينه كل من النبات والبكتريا، إذ تصنع
 البكتريا heam في حين يصنع النبات الجزء المتم له globin نتيجة للتعبير الجيني لمجموعة
 الجينات المثبتة للنتروجين *fix genes* (Lee et al., 1996)، وتشفره الجينات الواقعة على

البلازميدات العملاقة Mega plasmids في بكتريا *S. meliloti* (Gubler and Hennecke, 1988).



الشكل (4): مراحل حدوث العلاقة التكافلية بين بكتريا الرايزوبيوم والنبات البقولية (Bakkou, 2011)

4.5.2 آلية تثبيت النتروجين

تعد عملية تثبيت النتروجين الجوي بايولوجياً باختزال النتروجين الجزيئي الى الأمونيا من أهم أساسيات استمرار الحياة على الأرض، وتتضمن تحويل النتروجين الجزيئي الى الأمونيا بوجود انزيم النتروجيناز Nitrogenase.

وتتم عملية تثبيت النتروجين الجوي في البكتريود بانزيم النتروجيناز وذلك باختزال المعقد البروتيني الأول (Fe-Protein) لانزيم النتروجيناز بألكترون ينتقل اليه ضمن سلسلة نقل الألكترون بالفيرودوكسين (Ferredoxin)، وحينها يحدث تفاعل ايون المغنيسيوم مع جزيئة ATP لينتج مركبات حديد يفتقرن بالشكل المختزل للمعقد الأول، الذي ينقل الالكترونات الى المعقد النتروجيني الثاني (Mo-Fe-protein) يرتبط مع غاز النتروجين عند ذرتي الموليبيديوم، لتكون الأمونيا NH_3 بعد ثلاث نقلات متتالية من الالكترونات ضمن سلسلة نقل الألكترون (الفليح، 2000) وتستهلك كل نقلة أربع جزيئات من ATP ليبلغ مجموع ما تحتاجه في هذه العملية الى 12 جزيئة من ATP كما هو واضح في المعادلة الآتية:



وتنتقل الأمونيا لتكوين اليوريدات Uriedes والاميدات Amides التي تنتقل الى النبات (Rawsthorn *et al.*, 1980) ثم تتحول الأمونيا إلى ايونات الأمونيوم لتنتقل الى سايتوبلازم الخلايا (Kaiser *et al.*, 1998)، ثم تمثل الى وحدات من الأحماض الأمينية (الكلوتامين) بفعل الفعاليات المشتركة لانزيمي (Temple *et al.*, Glutamine synthetase & NADH (1998).

ويقاس مدى فعالية البكتريود في تثبيت النتروجين بقياس فعالية انزيم النتروجينيز وبعده طرق مباشرة وغير مباشرة تعكس من ثم المحتوى البروتيني للنباتات البقولية منها طريقة لوري Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) وطريقة كدال هي Kieldahi method (Keeney & Bremner, 1966) وتقانة اختزال الأستلين (Moustafa *et al.*, 1969) التي تعتمد على اختزال الأستلين في تقدير النتروجين، اذ تم تقدير نشاط انزيم النتروجينيز الذي يختزل الأستلين الى الأثيلين أو باستعمال النظائر المشعة، التي يعلم فيها النتروجين بنظيره المشع N^{15} .

5.5.2 بلازميدات بكتريا الرايزوبيوم ودورها في العلاقة التعايشية

تختلف بلازميدات بكتريا الرايزوبيا من حيث الحجم والعدد فقد يتراوح عددها ما بين 1-6 بلازميد (Eckhardt, 1978) والوزن الجزيئي لها من 120-550 مليون دالتون وتحمل الجينات التي تسيطر على بناء العلاقة التعايشية والتخصص العائلي بالمضيف النباتي وتكوين العقد المثبتة للنتروجين الجوي (Hooykaas *et al.*, 1981).

وتصنف البلازميدات الكبيرة الحجم Megaplasmids في بكتريا *S.meliloti* إلى صنفين: بلازميدات ذات وزن جزيئي أكبر من 450 مليون دالتون وتحمل الجينات Nif, Nod المسؤولة عن تكوين العقد وتثبيت النتروجين الجوي فيها، وبلازميدات ذات وزن جزيئي يتراوح بين 90-250 مليون دالتون ولا يحمل أي جينات خاصة بالعلاقة التعايشية مع نباتات الجت (Rosenbery *et al.*, 1983).

وتقسم الجينات الموجودة على البلازميدات في بكتريا الرايزوبيوم الى قسمين:

أولاً: الجينات الأعتيادية (Common genes)، وهي الجينات التي تشفر لبناء الوحدات المتكررة من الكلوكوز امين glucosamine الداخلة في بناء عوامل تكوين العقد ومن ضمنها جينات nod A,B,C & D المسؤولة عن ارتباط البكتريا بالشعيرة الجذرية وجينات nod I,J التي تشفر للبروتينات المستقبلية للمركبات المفردة في الشعيرة الجذرية وتتشابه في الأنواع المختلفة من الرايزوبيا (Spaink *et al.*, 1987).

ثانياً: الجينات المتخصصة بالمضيف Host specificity genes وتشمل جينات *nod F,E*, *L, H, P, & Q* (Schwedock & Long, 1990) وتشفر هذه الجينات لبناء الاحماض الدهنية والمعوذات الواقعة عند النهايتين غير المختزلة والمختزلة على التعاقب من سلسلة الوحدات المتكررة لسكر الكلوكوز الاميني ومجموعة acetyl عند النهاية غير المختزلة لجزيئة عوامل تكوين العقد (Mergaert et al.,1993) وتلغي الطفرة في هذه الجينات قابلية البكتريا على اصابة المضيف النباتي المتخصص باصابته وتكوين العقد او تؤخر تكوينها او تؤدي الى بناء علاقة تعايشية غير فعالة في تثبيتها للنتروجين او بناء نظام غير فعال مثل تعطيل الاصابة او منع تطوير خلايا البكتريا الى شكل البكتريود نتيجة لمنع عملية نقل الحوامض مثل fumarat, malate, dicaroxylacid الى العقد الناضجة (Engelke et al., 1989) فضلاً عن ان هذه الجينات مسؤولة عن تصنيع وانتاج مجموعة الحديد Heme المكونة لجزيئات Leghaemoglobin، وفي هذه الحالة فان حدوث أي طفرة فيها يؤدي الى تكوين عقد بيض غير مثبتة للنتروجين (Dickstein et al.,1991) ولذا لا يمكن تعويض حدوث أي طفرة على مستوى هذه الجينات بغرز البلازميد التعايشي الحامل للجينات المتخصصة بالمضيف لنوع اخر من بكتريا الرايزوبيا كما وتقع جينات تصنيع الاحماض الامينية وقواعد البيورين والبايريميدين وبعض جينات المقاومة للمضادات الحياتية وعدد من جينات *fix genes* وجينات *exod* و *exos* و *exor* و *exoc* و *mucr* في بكتريا *S.meliloti* على الكروموسوم الذي يبلغ حجمه 3650 Kb (Kondorosi et al., 1980).

وتوصلت الدراسات الحديثة إلى اكتشاف أكثر من 50 جيناً من جينات *Nod genes* لها علاقة بتكوين العقد (Kobayashi & Broughton, 2008)، إذ قسم (Dowine 1998) جينات الرايزوبيا إلى خمسة أقسام استناداً إلى فعاليتها في تكوين العقد وتثبيت النتروجين الجوي وهي الجينات المنظمة *Regulatory genes* والجينات المصنعة *Biosynthesis* والمحورة لعوامل تكوين العقد *Modiifcation of Nod* والمفرزة لعوامل تكوين العقد *Nod factor* *secretion* والمحفزة لافراز البروتين *Protein secretion* وغير معروفة الفعالية *Unknown* .function

وتتباين سلالات الرايزوبيا في عدد النسخ لهذه الجينات إذ أن بكتريا *Sinorhizobium melioli* تمتلك ثلاث نسخ من مجموعة الجينات *Nod genes* في حين تمتلك *Bradyrhizobium japonicum* ما بين 2-5 نسخ، في حين تمتلك *R.trifolii* نسخة واحدة من الجين *nod D* (Vanrhijn & Vanderleyden, 1993).

6.2 آليات الانتقال الأفقي للجينات

تحدث العديد من الإتحادات الوراثية الجديدة التي ينتج عنها تغيرات وراثية واضحة في البكتيريا وفي الكائنات الحقيقية النواة نتيجة لنقل الحامض النووي DNA ما بين البكتيريا نفسها والكائنات الأخرى مؤدياً ذلك لظهور صفات جديدة على الكائن الحي، وأظهرت مختلف الدراسات الوراثية أن الانتقال الأفقي Horizontal Transfer بين مختلف الكائنات ومنها المجتمعات البكتيرية (Amabile-Cuevas & Chicurel, 1992) له دور متخصص في تطوير الكائنات المجهرية على الرغم من صعوبته بسبب السيطرة عليه وراثياً (Lorenz & Wackernagel, 1994).

وهناك ثلاث آليات رئيسة للتبادل الوراثي في البكتيريا يطلق عليها مجتمعة بالية الانتقال الأفقي للجينات، وتضمن احتمالية انتقال الجينات للحصول على سلالات بكتيرية جديدة للتعامل معها بشكل واسع باستعمال العمليات الحيوية المختلفة (Prescotta et al., 2007).

1. التحول Transformation

تعرف هذه الظاهرة بأنها عملية نقل المعلومات الوراثية بإدخال قطعة DNA إلى داخل الخلية الحية واندماجها مع المادة الوراثية للخلية المستقبلية دون الحاجة إلى الإتصال السريع المباشر بين الخليتين (Roberts, 2003)، وتتضمن هذه العملية ثلاث مراحل أساسية وهي الإدصاص Adsorption والإختراق Penetration والإنغراس Integration لقطعة DNA إلى داخل كروموسوم الخلية المستلمة وإعادة اتحادها لتكوين Recombination DNA (Carpenter, 1977). كما في نقل بلازميدات *A.tumefaciens* إلى *Rhizobium* وبذلك ستمتلك الأخيرة القابلية على إحداث الأمراض وتكوين الأورام التاجية على النباتات المصابة بها (Hatterman & Stacey, 1990).

2. التوصيل Transduction

يعبر مصطلح التوصيل Transduction عن إنتقال الحمض النووي DNA الحامل للمعلومات الوراثية المرغوب نقلها من بكتيريا إلى أخرى باستعمال الفايروسات نواقل طبيعية لنقل الجينات الحاملة لهذه الصفات (Snusted & Simmons, 2000).

3. الاقتران Conjugation

يسمح الإقتران البكتيري بانتقال قطع كبيرة من المادة الوراثية DNA الخارج كروموسومية المعروفة باسم البلازميد بالتماس المباشر أو الإتصال الفيزيائي بين أنواع البكتيريا مسببة بشكل

رئيس نقل عوامل المقاومة للمضادات الحيوية وعوامل الضراوة للإمراضية (Liosa et al., 2002)، ويكون على نوعين:

1- النقل الإقتراضي بين F^+ & F^-

تعد ظاهرة الإقتران إحدى التقانات المهمة لحدوث تغيرات وراثية أو مظهرية تسهم في تطوير الكائنات المجهرية في مختلف المجمعات البيئية كالتربة والماء وذلك بنقل المعلومات الوراثية من الخلية الواهبة Donor Cell، F^+ إلى الخلية المستلمة Recipients Cell، F^- (Williams et al., 1996). ويتطلب حدوثها توفر عوامل كيميوية ووراثية محددة (Willets & Wilkins, 1984)، علما ان البلازميدات الإقتراضية لها القابلية على السيطرة على عملية الإقتران بعوامل وراثية ناقلة واقعة على DNA البلازميدي تدعى جينات النقل Transfer genes، إذ تعمل هذه الجينات التركيبية على التشفير لتكوين الشعيرات الجنسية (Pili) على جدار الخلية الواهبة عند حصول الإقتران بين F^+ و F^- لتربط بين الخليتين مكونة ما يسمى بجسر الإقتران Conjugation bridge أو أنبوب الإخصاب Pilus (Fullner et al., 1996). وتكمن وظيفته في سحب الخليتين وشدهما لبعضهما ليصبحا أكثر قرباً ويتراوح معدل طوله (1) مايكرومتر لينتقل عبره أحد شريطي DNA البلازميدي المزدوج الى الخلية F^- (، ويبلغ معدل سرعة انتقال السلسلة حوالي 47Kbp/min (Hartwell et al., 2000)، ويبدأ الإنتقال بعد كسر إحد شريطي DNA عند تسلسل معين يطلق عليه Bomsequence بالإنزيمات القاطعة Endonuclease التي يشفرها الجين المتحرك mob gene لتتولد نهايتا سلسلة DNA (3', 5') ويبدأ انتقال السلسلة المكسورة عند موقع متخصص Origin of transfer (oriT) ابتداء من النهاية 5' للخلية المستلمة عبر جسر الإقتران (Willets & Wilkins, 1984; Strohmaier et al., 1998). في أثناء عملية الإقتان تصنع الخلية الواهبة الشريط المتمم للحمض النووي البلازميدي الواهب مستعملاً السلسلة الأخرى بوصفه قالباً بعدئذ تنتقل السلسلة المنفردة لجزئية DNA بشكل مستقيم وبعد دخولها الخلية المستلمة تعمل بوصفها قالباً لصنع الشريط المتمم له ويرتبطان ليعود البلازميد الى شكله الطبيعي جزئيةً مزدوجة السلسلة دائرية (Bradley, 1981) وعليه تصبح الخلية F^- و F^+ قادرة على نقل عامل الخصوبة (F) الى خلية مستلمة أخرى لامتلاكها كل متطلبات النقل المختبري وهي mob protein و Tra genes و ori T (Wessells & Hopson, 1988). وقد وفرت هذه العملية كسر حاجز التخصص بنقل الصفة التي يمتلكها نوع بكتيري الى نوع اخر وادت الى اكساب الخلية المستلمة الوحدات الوراثية التي تشفر للصفة المرغوبة كالمقاومة للعديد من

المضادات الحيوية التي تكون مسؤولة عن تراكم محددات المقاومة وتضاعفها في المادة الوراثية للخلايا البكتيرية (Lujan et al., 2007).

2- النقل اللاقتراني بين F^- و HFr

على الرغم من قدرة البلازميد الإقتراني على التضاعف الذاتي فإنه يلتحم في بعض الاوقات مع المادة الوراثية للخلية (الحمض النووي الخلوي) وذلك لاحتوائه على ترددات تدعى العناصر الإنتقالية (Tn) Transposable elements، ويتم ذلك بفتح الإنزيمات الخلوية حلقة الحمض النووي البلازميدي والحمض النووي الخلوي والتحام نهاياتها على البلازميد المفتوح مع الأطراف المفتوحة للحمض النووي الخلوي وتتداخل معه، وتدعى مثل هذه الخلايا بالخلايا الإتحادية عالية التردد High frequency recombination (Hfr) cells لتضاعف الخلية بعدها الحمض النووي المتحد وتتقسم وتستنسخ نسخة إضافية من البلازميد الذي ينفصل عن الكروموسوم (الفصل، 1999) ويليه حصول حالة النقل اللاقتراني بين هذه الخلية مع الخلية الإنثوية F^- بوصفها خلية مستلمة. وبعد تلامس الخلايا وتكوين أنبوب الإقتران بين الخليتين، يحدث كسر إنزيمي في أحد خيطي الـ DNA المزدوج في موقع وحيد Origin of transfer لسلالة (Hfr)، ليبدأ بعدها نقل الخيط المكسور من النهاية 5^- في الخلية الواهبة عبر انبوب الإقتران الى الخلية المستلمة، ثم يحصل تضاعف لتكوين الشريط المتم لتصبح بعد ذلك الخلية المستلمة ثنائية المجموعة الكروموسومية (Fullner et al., 1996).

7.2 الإقتران في عائلة Conjugation in Rhizobaceae

تناولت الدراسة التي أجراها Bedmar وآخرون (1984)، نقل البلازميد PIJ 1008 العائد لبكتريا *Rhizobium leguminosarum* إلى بكتريا *S. meliloti* بتقانة الإقتران الذي يعمل على استقطاب الهيدروجين في خلايا الرايزوبيوم التعايشية وأكسدته بانزيم النتروجينيز لانتاج الطاقة اللازمة لتكوين العقد الجذرية على نباتات الجت بالبكتريا الناتجة من الإقتران، في حين تناولت دراسة أخرى نقل بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية بين سلالات مختلفة من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* ومن بكتريا *E. coli* الى بكتريا *Rhizobium leguminosarum* وأظهرت الأخيرة مقاومة للمضادات الحيوية بمستوياتها نفسها في الخلايا الواهبة بإستثناء Carbencillin الذي أبدت البكتريا تجاهه مقاومة أعلى (Beringer, 1974).

وأكدت الدراسة التي اجراها Levin وآخرون (1976)، إمكانية استعمال *A. tumefaciens* خلايا واهبة أو مستلمة في عمليات الإقتران، إذ تمكن من نقل بلازميدات RP4 من *E. coli* إلى بكتريا *A. tumefaciens* ومنها إلى سلالة أخرى من بكتريا

A. tumefaciens، وكشف عن نجاح التحول الوراثي وإثباته بالفحوصات الكيموحيوية . ونقل بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية من *Rhizobium leguminosarum* إلى *A. tumefaciens* وأدى ذلك الى ظهور صفات وراثية جديدة في البكتريا الناتجة من الإقتران. هذا فضلاً عن توصيف البلازميدات الإقترانية لمختلف أنواع البكتريا التابعة لجنس *Agrobacterium* ضمن عائلة *Rhizobaceae*، في كل من *A. tumefaciens* و *A. radiobacter* و *A. rhizogenes* و *A. vitis* وكذلك البلازميدات المشفرة للأوبين (Opine) بوصفه عامل الضراوة لهذه البكتريا. (Kim & Gadd, 2008).

وتمكنت إحدى الدراسات من نقل جينات *nif genes* من سلالة الرايزوبيوم *Rhizobium trifolii* الحاملة لجينات المقاومة للأدوية Plasmid R1 الى *E. coli* بالإقتران وإكساب الأخيرة صفة تكوين العقد في البرسيم الأحمر والأبيض (Red & White clover (Skotinicki & Rolfe, 1978)، ونقل جينات بكتريا *E. coli* السلالة (TIK) بوصفها السلالة الواهبة الى بكتريا *Klebsiella* ذي السلالة (418rif) وتراوحت كثافة تردد الإقتران وانتقال جينات (*nif Rt genes*) فيها (10^{-6} - 10^{-7}) واطهرت النتائج ان البكتريا الناتجة من الاقتران حاملة لجينات nif^{+} ومقاومة لمضاد. Kin (Dunican & Tierney, 1974)، واستنتج Dunican وآخرون (1976)، أن بكتريا *R. trifolii* تمتلك كل المادة الوراثية الضرورية لتثبيت النتروجين وأن هذه الجينات توجد على البلازميد الثابت للبكتريا، وقد حقق أول نجاح في إظهار الارتباط التصنيفي ما بين البكتريا المكونة للعقد الجذرية *Rhizobium* في نقل القابلية على تكوين العقد الى *Agrobacterium* بنقل البلازميد التكافلي (Sym-plasmid) من *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* إلى بكتريا *A. tumefaciens* التي سبق أن حيد محتواها البلازميدي pTi-cured، والتي على أساسها افترض أن هناك توسيعاً للمدى المضيفي للرايزوبيوم حين نقل صفة تكوين العقد وتثبيت النتروجين الى الاكروبيكتريوم (Hooykaas et al., 1982). وقد قيمت القابليات الإقترانية في بكتريا *Rhizobium etii* (CFN 42) التي تحفز تكوين العقد المثبتة للنتروجين على جذور نبات *Phaseolus vulgaris* وتتوزع المادة الوراثية فيها ما بين الكروموسوم المنفرد وستة بلازميدات، باستعمال سلالة *A. tumefaciens* الفاقدة لبلازميد Ti بوصفها سلالة مستلمة، وكشفت الدراسة عن امتلاك السلالة الأولى بلازميد P42 ذاتي الانتقال بتردد عالٍ يصل الى 10^{-2} (Brome et al., 2000). واستعملت بكتريا *A. tumefaciens* بكتريا واهبة لبلازميد Ti الى البكتريا *E. coli*

(S17-1Pir) ونتج عنها بكتريا محولة وراثياً قادرة على إحداث التحول الوراثي في النباتات وتوسيع المدى المضيضي للأولى في إحداث مرض الأورام التاجية باستعمال البكتريا الناتجة من الإقتران (Kiyokawa et al., 2009). وأوضحت الدراسة التي أجراها Hooykaas وآخرون (1977) أن إندماج بلازميدات المقاومة لبكتريا *E.coli* مع بلازميد Ti لبكتريا *A.tumefaciens* يزيد من كفاءة النقل الإقتراني من *A.tumefaciens* إلى جنس الرايزوبيوم ويرفع نسبة تردد الإقتران فيها.

8.2 اعتماد نباتات الجت موديلاً لفهم العلاقات على المستوى الوراثي

تناولت معظم الدراسات الوراثية الخاصة بتثبيت النتروجين مختلف النباتات البقولية مثل الجت *Medicago sativa* و *M.truncatula* (Suliman&Schulze, 2010; Schiene et al., 2004) وفول الصويا والبرسيم والعدس والبقلاء والبراليا (Gepts et al., 2005)، ولم تقتصر هذه الدراسات على جانب تحسين النبات البقولي من ناحية النمو والإنتاج بل أكدت على قدرة هذه النباتات على تثبيت النتروجين الجوي وبكميات كبيرة (El-Turki, 1995)، مع استعمال الآليات الممكنة لتطبيقها لرفع مستويات تثبيت النتروجين في هذه النباتات، كانتخاب جرع اللقاح التي تحفز تكوين أكبر عدد ممكن من العقد المثبتة للنتروجين في نباتات الجت (Heggo & Barakan, 2004).

ولصعوبة انجاز معظم الدراسات الوراثية الخاصة بتكوين العقد الجذرية للنباتات البقولية نظراً لكبر حجم المادة الوراثية، وصعوبة كلونة الجينات التعايشية لهذه النباتات، ما دفع الباحثين الى انتخاب عدد من النباتات موديلاً لتفسير العلاقات التعايشية على المستوى الوراثي مع بكتريا الرايزوبيوم وقد وقع الاختيار على نباتات الجت *M.truncatula* لامكانية تحليلها على المستوى الوراثي والجزيئي لصغر حجم مادته الوراثية (diploid) ولقصر دورة حياته ولقدرتها على الاخصاب الذاتي وعلى التكيف لمختلف الظروف البيئية (Somers et al., 2003) ولسهولة تحولها الوراثي باستعمال *A.rhizogenes* التي تحفز على تكوين الجذور التي تمتاز بقابليتها العالية على الإصابة وتكوين العقد الجذرية الفعالة فيها (Boisson-Derrier et al., 2001) ولامكانية استجابته لمختلف المطفرات مثل اشعة كاما (Sagan et al., 1995)، فضلاً عن انجاز البحوث الكثيرة التي عنيت بدراسة علاقته التعايشية مع بكتريا *S. meliloti* المتخصصة باصابته مقارنة بالأنواع الأخرى من بكتريا الرايزوبيوم (Garcia-Plazaola et al., 2000) لذلك استعملت نباتات الجت بشكل واسع لدراسة الجينات المسؤولة عن بناء العلاقة التعايشية مع بكتريا الرايزوبيوم وتشخيصها، التي تشمل الجينات المسيطرة على دخول الخلايا البكتيرية الى

المضيف النباتي وعلى تصنيع عوامل تكوين العقد (*nod genes*) والجينات المسؤولة عن التخصص العائلي وتطور البكتريود (Sutton et al., 1981)، إذ اشار احد الباحثين (Maryonne et al. , 1994) من خلال دراسة التباينات الوراثية بين أنواع الجت المختلفة الى تفوق نباتات الجت *M. sativa* على نباتات *M. truncatula* في نسبة تثبيتها للنتروجين الجوي من خلال استعمال النتروجين المعلم، وكفاءة العقد الجذرية في تثبيتها لمستويات عالية من النتروجين، بدلالة تضاعف مستوى الأسبارجين، والمالات، وارتفاع المحتوى البروتيني لنباتات *M.sativa* إلى ثلاثة أضعاف المحتوى البروتيني لنباتات *M.truncatula* (Sulieman &Schulze, 2010)، ونظراً لامتلاك نباتات الجت لدرجة عالية من التباين الوراثي، لذلك فقد استعمل في مجال دراسة التعبير الجيني Gene expression لمختلف انواع الجينات (Hoori et al., 2007). واستعملت ايضاً نباتات الجت في العديد من البحوث مودياً لتطبيق بروتوكولات التحول الوراثي بمختلف سلالات بكتريا *A.tumefaciens* مثل السلالة IDI6069 و C58 و In1609 التي استبدلت بلازميداتها فيما بين السلالات المختلفة واعيدت إصابة النبات فيها وتكوين الأورام التاجية عليه (Palumbo et al., , 1998)، واستعملت مودياً نباتياً لفهم التحولات الوراثية في البقوليات ولاسيما الصنف Jemalong لقابليته على التحول الوراثي مختبرياً وعلى استحداث الكالس المحول وراثياً وتمايزه الى نباتات جت متميزة ومحولة وراثياً قادرة على انتاج اعداد كبيرة من البذور بالزراعة المرافقة مع بكتريا *A.tumefaciens* (Thomas et al., 1992).

9.2 الزراعة النسيجية للنباتات التابعة للعائلة البقولية

تمتلك النباتات البقولية أهمية إقتصادية كبيرة في مجال إقتصاديات النتروجين وتوفير الغذاء ومختلف الصناعات لكونها من أهم المصادر للأحماض الأمينية الأساسية لتكوين البروتينات والزيوت النباتية (عجام، 1986)، وقد تطورت تقانات الزراعة النسيجية في السنوات الماضية في مختلف المجالات المتعلقة بالنبات، كانتاج نباتات مقاومة للأمراض (Dodds & Robert, 1985)، أو مقاومة لمبيدات الأعشاب (Song & Walworth, 2012)، وانتاج نباتات مقاومة للانجماد (Mckersie et al., 1993)، إذ طبقت هذه التقانة مع نباتات العائلة البقولية بهدف استحداث الكالس من الأجزاء النباتية المختلفة وانتاج نباتات كاملة منه.

وأشارت مجموعة من الدراسات التي تناولت الأنواع البقولية الإقتصادية إلى امكانية تكوين الكالس من أوراق نباتات الجت *M.sativa* (Chou & Wang, 1998)، وأدى اعتماد النباتات المتمايزة من الكالس والمعلقات الخلوية الى حدوث تغييرات في إعادة انتظام التركيب

الوراثي مما يترتب عليه ظهور إختلافات جسمية (SCV) Somaclonal Variation واسعة استعملت في مجالات تربية وتحسين النباتات (Pierik, 1987).

وأختبرت إحدى الدراسات قابلية عدة أنواع من نباتات الجت *M.sativa* (Rangelander, Roamer, Spreado-26, Dupuits) على إستحداث كالس أجزائها النباتية المختلفة وتمايزها، وأثبتت الدراسة تفوق النوع Roamer على بقية الأنواع في تكوين الأجنة وتمايزها، وتميزت النباتات الناتجة بخضوعها لظاهرة Somaclonal Variations، التي أظهرت إختلافات جسمية واضحة متمثلة بكبر حجم الأوراق ومحتواها من الكلوروفيل والأنثوسيانين، واستعملت النباتات والخلايا المعلقة والبروتوبلاست طرقات كفاءة للإكثار الدقيق لهذه النباتات (Shah et al., 2003)، وتستعمل النباتات المتميزة أساساً لتنفيذ برامج الهندسة الوراثية للحصول على النباتات المحولة وراثياً (Hansen & Wright, 1999) وكان أول تمايز لنباتات الجت من الأجنة الجسمية قد سجله الباحثان (Saunders & Bingham, 1972)، تلى ذلك استعمال العديد من البروتوكولات الناجحة التي ضمنت تمايز كالس نباتات الجت من الأجزاء المختلفة (Matheson et al., 1990).

وأكد العديد من الدراسات أن تمايز نباتات الجت يعتمد بدرجة كبيرة على النمط الوراثي للنبات (Samac et al., 2004) والتلاعب في مختلف الظروف المؤثرة في إستحداث الكالس وتمايزه كدرجة الحرارة والضوء ومكونات الوسط الغذائي وانتخاب النمط الذي يمتلك القابلية على التمايز (Crea et al., 1995)، واستعمال مختلف التداخلات لإيجاد نظام يضمن نجاح عملية تمايز الكالس وتكوين النباتات الكاملة، إذ تمكن Hindson وآخرون (1998) من استحداث كالس نباتات الجت من الأجنة الجسمية Somatic embryo وتمايزه باستعمال الوسط MS المدعم بـ(1µm) ABA و 50mm كلوتامين و5% سكروز واستعمال هذه الأجنة لتكوين البذور الصناعية Artificial seed (Senaratha et al., 1989)، إذ عدت الأجنة الجسمية الأداة الرئيسية للحصول على النباتات المحولة الخصبة والمكونة للبذور بمقدار خمسة أضعاف النباتات الأعتيادية بالإعتماد على انتخاب النمط الجيني Gene type الملائم لإنتاج نباتات الجت تحت الظروف الحرجة (Xu & Bewley, 1991).

وتناولت إحدى الدراسات (Zagorksa et al., 1997) استحداث كالس أربعة اصناف من الجت *M. sativa* (Boyalala وBoynitza و3815 و494) ولوحظ إختلافات كبيرة بين الأنماط الوراثية في قابليتها على استحداث الكالس إذ تراوحت نسب الأستحداث من 11- 77% وتمايزه ما بين 4.8-15.2 % وتمايز الأجنة الجسمية للجت.

وقد أبدى النمطان الوراثيان للجت Regensy و Regens استجابة بارزة في تكوين أكبر عدد من الأفرع الخضرية بالمقارنة مع بقية الأنماط الوراثية التي استعملها (Samac *et al.*, 2004)، وتشير الدراسات إلى وجود جينات تسيطر على تمايز هذا النبات، وتتطلب عملية تحفيزها توفير ظروف متكاملة بالتلاعب بمنظمات النمو 2, 4-D و Kin ومحتوى الوسط من أيونات الأمونيوم والInositol ومستخلص الخميرة والأحماض الأمينية وغيرها (Seitzkris & Bingham, 1988).

وتمكنت إحدى الدراسات من إنتاج النباتات من الكالس المشتق من المبايض ومختلف الأجزاء النباتية للجت حين تنميتها على وسط Blayds basal medium المدعم بالتراكيز (0.8 µm) من NAA و 2 غم/لتر من خلاصة الخميرة ومختلف التداخلات من NAA و 2iP (Saunders & Bingham, 1975) وأشارت دراسة أخرى إلى أهمية أيونات الأمونيوم في تحفيز التمايز لكالس المعلقات الخلوية لنباتات الجت *M.sativa* (Walker & Sato, 1981)، وتوصلت الدراسة التي أجراها Monteiro وآخرون (2003) إلى استحداث كالس البروتوبلاست لنباتات الجت المعزول من الأوراق والأجنة الجسمية وتمايزه واستعمال البروتوبلاست المعزول أداة للتحويل الوراثي بدمج بروتوبلاست الأنواع المختلفة كهربائياً، وأشارت دراسة أخرى إلى استحداث كالس الجت من قطع الأوراق والجذور (النعيمة وآخرون، 1996أ).

وأكدت إحدى الدراسات تكون الكالس من قطع السيقان لنباتات البرسيم *Trifolium arvense* بعد (4-8) ساعات من زراعته على وسط MS المدعم 2.0 ملغم/لتر NAA وبتراكيز متباينة (1.0، 3.0، 4.0، 5.0، 6.0) ملغم/لتر 2,4-D (Bond & Webb, 1989).

وتمكنت دراسة أخرى من استحداث الكالس من الأجزاء المختلفة لنباتات *Vicia faba* (Thipmani, 1984). وأشارت دراسة أخرى إلى إمكانية استحداث الكالس الهش من قطع السيقان الفلقية لبادرات الفاصوليا حين زراعتها على وسط B5 المدعم بالتراكيز المتداخلة من NAA و BA (Mohamed *et al.*, 1993).

وتوصلت الدراسة التي أجراها (المهداوي، 2013) إلى تمايز نباتات الحلبة من كالس العقد الفلقية المستأصلة من بادرات الحلبة *Trifonella Foenum-graceum* حين زراعتها في وسط MS المجهز بالـ 2.0 ملغم/لتر BA و 1.0 ملغم/لتر NAA.

ووظفت تقانة الزراعة النسيجية لإنتاج نباتات خالية من المسببات المرضية، فقد انتخبت نباتات بازلاء *Pisum sativum* L مقاومة للفطر *Fusarium solani* وتحمل تغيرات

مظهرية متمثلة بإنخفاض عدد الأفرع والأزهار من إضافة رواشح الفطر المذكورة آنفاً بالتراكيز 10.0 و 12.5 % الى مزارع تنمية الكالس (جمال وعبد الله، 2008).

ويشير عدد من الدراسات الى صعوبة استجابة نباتات فول الصويا *Glycine max* للزراعة النسيجية (النعمي ورشيد، 1996) لذا لجأ عدد من الباحثين الى استحداث مزارع الكالس لفول الصويا من الأجنة غير الناضجة (النعمي وآخرون، 1996ب)، واستعمال المطفرات الفيزيائية كأشعة كاما بهدف أحداث تغييرات وراثية فيه (البياتي، 2002). وبإنشاء مزارع المعلمات الخلوية وزراعتها بتقانة قطرات الأكار المتعددة (النعمية، 2005).

10.2 التفاعل التضاعفي المتسلسل Polymerase Chain Reaction PCR

جاء وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA أول مرة من قبل الباحثين Mullis و Faloona عام (1985)، ويعد تفاعل سلسلة متعدد البلمرة من الطرائق الفعالة والمنتشرة في علم البيولوجي الجزيئي، وهي عبارة عن تفاعل انزيمي خارج خلوي (*In vitro*) تضاعف فيه منطقة صغيرة من الـ DNA او من الجين الكلي أو استنساخ اعداد ضخمة جداً من الجينات المرغوب فيها انزيمياً الى ملايين النسخ في ساعات قليلة (Didonato et al., 1993)، وذلك باستعمال جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler) الذي يوفر درجات الحرارة اللازمة لكل مرحلة من التفاعل وبوجود البادئات Primers التي ترتبط بالنتائج المكمل لها على شريط الـ DNA القالب Template DNA فضلاً عن انزيم البلمرة (Taq DNA Polymerase) الثابت في درجات الحرارة العالية والمعزول من بكتريا *Thermus aquaticus* والنيوكليوتيدات الأربعة الرئيسية (DNTPs) وتشمل:

Deoxyadenosine Triphosphat (DATP)

Deoxycytidine Triphosphat (DCTP)

Deoxyguanosine Triphosphat (DGTP)

Deoxythymidine Triphosphat (DTTP)

وكذلك المحلول المنظم الحاوي على $MgCl_2$ اللازم لعمل انزيم البلمرة، وقد تم بهذه التقانة اكنار واستنساخ الجينات بالكامل في أنابيب صغيرة (Eppendorf tubes). ومن مميزات هذه التقانة انها لا تتطلب كمية كبيرة أو نوعية عالية من الـ DNA المستعمل قالباً، إذ ان كمية الـ DNA اللازمة لاجراء التفاعل ممكن أن تكون بقدر كمية الـ DNA في خلية واحدة فضلاً عن أن سهولة التعامل مع الـ PCR التي جعلت من الممكن تحليل أعداد كبيرة من النماذج وبكلفة يسيرة ووقت أقل (Ehrlich and Greenberg, 1992)، وتعد هذه التقانة يسيرة وسريعة

وشديدة الحساسية ولا يلزم أن يكون DNA نقياً لاجل مضاعفته على شرط ان لا تحتوي العينة على شوائب يمكنها تثبيط انزيم البلمرة (Al-Kahtani *et al.*, 2008).

1.10.2 خطوات التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA

تتضمن هذه التقنية دورات متعددة لتضاعف قطعة DNA تتكون كل دورة من مراحل متتابعة ومتكررة ضمن برنامج محدد يغذي به جهاز المبلر الحراري وهي:

1. مرحلة المسخ Denaturation

هي أول مرحلة من مراحل التفاعل التي يحول فيها شريط DNA الذي عزل من شريط مزدوج (Double Strand DNA, dsDNA) الى شريط منفرد (Single Strand DNA, ssDNA) وذلك بتعرضه الى درجة حرارة عالية (94-98)°م ومدة (3-5) دقائق تقريباً لضمان تكسير الأواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي DNA وليسهل انجاز الخطوة اللاحقة وليسلك كل شريط قالباً وليتم بناء قطعة مكملة له، وتستغرق هذه الخطوة دقيقة واحدة مع توقف جميع التفاعلات الأنزيمية فيها (Paolella, 1998).

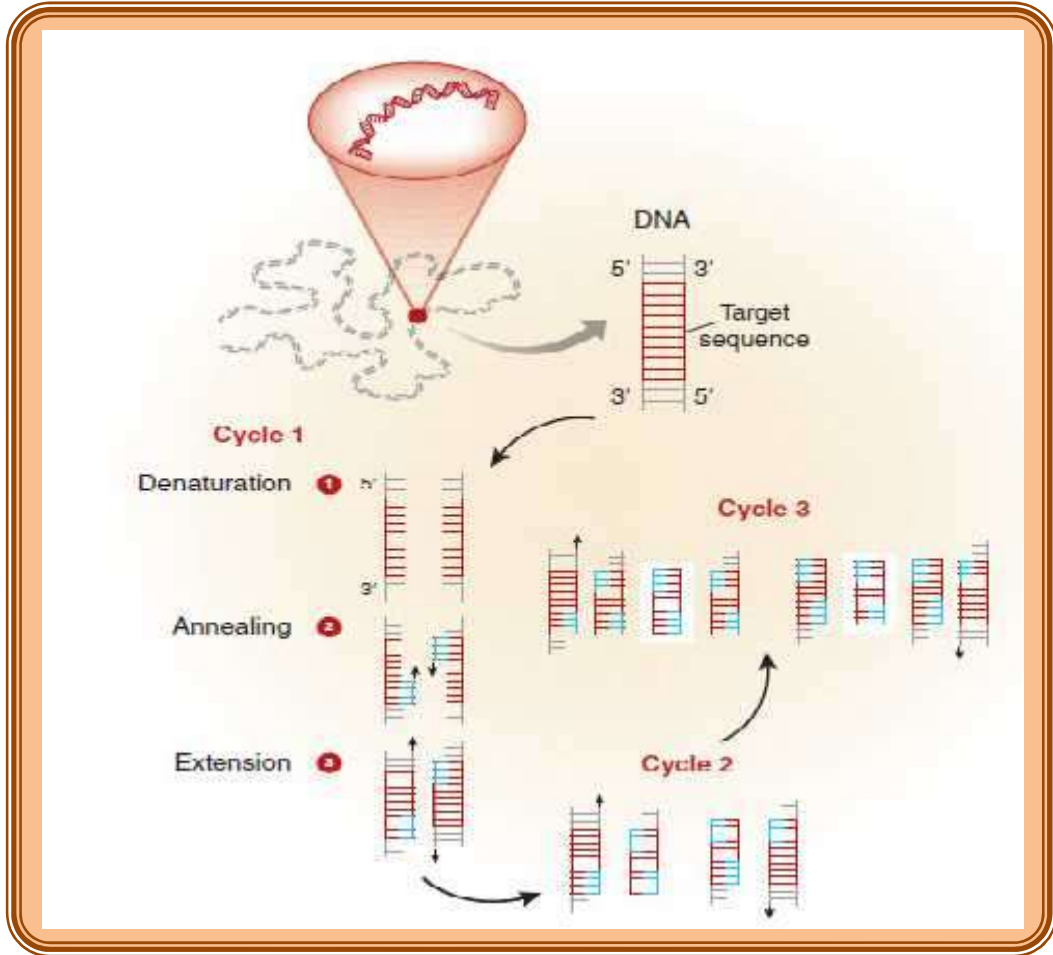
2. مرحلة ارتباط البادئ أو اعادة المسخ Primer Annealing or Renaturation Stage

وتخفف هذه المرحلة درجة حرارة خليط التفاعل وذلك للسماح للبادئ بالارتباط بالموقع المكمل على شريط المفرد (ssDNA) وبناء الأواصر الهيدروجينية وتختبر هذه الدرجة والتي تكون ما يقارب (55)°م أو تحدد بالاعتماد على طول البادئ المستعمل ونوعية أحتواءه على القاعدتين (G+C) ونسبتها ويمكن حساب درجة الحرارة الملائمة لارتباط البادئ من خلال حساب درجة حرارة الذوبان (Wu *et al.*, 1991) Melting Temperature (MT).

3. مرحلة الاستطالة Extension Stage

هي المرحلة الأخيرة من تفاعل PCR ويضاف النيوكليوتيدات الاربعة (DNTPs) في منطقة ارتباط البادئ بقالب DNA عند النهاية 3' ليبنى شريط DNA مكملاً للقالب بواسطة انزيم البلمرة، ويتم ذلك برفع درجة حرارة التفاعل الى (72)°م وهي الدرجة الحرارية المثلى لعمل انزيم البلمرة Taq Polymerase بأعلى كفاءة وبانتهاء هذه المرحلة تنتهي أول دورة تفاعلات PCR وناتج هذه الدورة سوف يستعمل قالباً للدورات اللاحقة (Wilson & Walker, 2004) وتكرر الدورات برفع الحرارة لاجل مسخ DNA وهكذا الى ان تستكمل دورة ثانية وثالثة... الخ (الشكل 5) ويحدث تغيير درجات الحرارة في الخطوات السابقة من تفاعل PCR في ضوء برنامج خاص يستعمل لتشغيل جهاز المبلر الحراري، وينتج عن PCR مضاعفة لقطع الحمض النووي لآلاف المرات دون الرجوع الى عملية الكلونة للجين Gene Cloning باستعمال الأحياء الدقيقة او البلازميد التي يتطلب العمل فيها فترات طويلة ومتطلبات وظروفاً خاصة فضلاً عن أن الأعداد

المنتجة بالأحياء الدقيقة لا تضاهي الأعداد الكبيرة الناتجة باستعمال الـPCR، إذ يمكن إنتاج ملايين النسخ من الـDNA المطلوب في (25-30) دورة التي تستغرق نحو (3-4) ساعات (Erlich et al., 1991).



الشكل (5): خطوات دورة التفاعل التضاعفي المتسلسل للـPCR (Garibyan &Arashi .,2013)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and methods

1.3 تحضير الأوساط الغذائية

1.1.3 الأوساط الزرعية المجهزة تجارياً

حضرت الأوساط الزرعية الجدول (1) حسب تعليمات الشركة المجهزة وضبط الدالة الحامضية (pH) وعقمت بحسب الظروف المثلى لكل وسط.

الجدول (1) أنواع الأوساط الغذائية الجاهزة

اسم الشركة المجهزة	الأوساط الغذائية
Lab. M. Limited England	MacConkey Agar
Lab. M. Limited England	Nutrient Agar
Lab. M. Limited England	Nutrient Broth
Lab. M. Limited U.K.	PDA Medium
Lab. M. Limited England	Simmons Citrat
Lab. M. Limited England	Triple Sugar Iron (TSI)
Lab. M. Limited England	Tyrosine Agar Medium

2.1.3 الأوساط الزرعية المحضرة مختبرياً

حضرت جميع الأوساط المحضرة مختبرياً الجدول (2) بإذابة المكونات الخاصة بكل وسط بوزن مكوناتها الواردة في الملحقات التابعة لها، وبشكل مستقل إذابة تامة في حجم معين من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى (1) لتر، وضبطت الدالة الحامضية (pH) بما يلائم كل وسط باستعمال جهاز (pH meter)، وعقمت الأوساط بوضعها في المؤصدة (Autoclave) (121°م، 1 جو، 20 دقيقة)، أما السكريات والمضادات الحيوية فقد اضيفت الى الأوساط الغذائية المعقمة والمبردة الى درجة (45-50) °م بعد تعقيمها باستعمال المرشحات الغشائية الدقيقة البالغ حجم تقوبها (0.22) ملي مايكرون.

الءءول (2) أنواع الأوساط الغذائفة المءضرة ومصادرها والغرض من استعمالها

الأوساط الغذائفة	المصدر	رقم الملءق	الغرض من استعمالها
Agrobacterium Mannitol (AM)	(Murugesan et al., 2010)	(8)	وسط عزل <i>A. tumefaciens</i>
Glucose Poptone Agar Medium (GPA)	(Ronald, 2006)	(15)	وسط انتخابف للبءكترفا <i>A. tumefaciens</i>
King B Medium	(Ronald, 2006)	(14)	وسط انتخابف لبءكترفا <i>A. tumefaciens</i> البرفة
Lurria Bertani Medium (LB)	(Miller, 1987)	(16)	وسط انتخابف لبءكترفا <i>A. tumefaciens</i> البرفة مءلفاً
Nutrient Glucose Agar Medium (NGA)	(Moore et al., 1988)	(3)	لغرض زراعة بءكترفا الاكروءكترفوم قبل اءراء الأءتبارات الخاصة بءءفء الطراز الءفوف
Carbohydrat Fermentation Medium	(Atlas, 2010)	(1)	لغرض اءءبار ءءمفر البءكترفا للسكرفا
Lactose Agar Medium	(Moore et al., 1988)	(7)	لغرض اءراء اءءبار اءءاف-3 Ketolactose Production
Motility Test Medium	(Moore et al., 1988)	(5)	لغرض اءءبار ءركة البءكترفا
PDA-CaCO ₃ Agar Medium	(Moore et al., 1988)	(4)	لءءفء الطراز الءفوف لبءكترفا الاكروءكترفوم واءءافها للءامض
Tryptone Yeast Medium (TY)	(Khenuja & Kumar, 1988)	(2)	أءءبار ءركة بءكترفا الرافزوففوم
Yeast Extract Beef Medium (YEB)	(Lichtenstein & Draper, 1986)	(6)	لءفظ وءءفر لءاف بءكترفا <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58C1)
Yeast Extract Mannitol Medium (YEM)	(Vincent, 1970)	(13)	لءفظ وءءفر لءاف بءكترفا الرافزوففوم
B5 Medium	(Gamborg et al., 1968)	(11)	لغرض اسءءءاف الكالس
Murashige & Skoog Medium (MS)	(Murashige & Skoog, 1962)	(9)	لغرض ءءمفة الباءراف واسءءءاف وءمافز الكالس
Woody Plant Medium (WP)	(Lloyd & McCown, 1980)	(10)	لغرض ءءمفة الباءراف الملقءة بالاكروءكترفوم
Nitrogen Free Medium (NF)	(Fahraeus, 1957)	(12)	لغرض زراعة البءور وءءمفة الباءراف الملقءة وءفر الملقءة ببءكترفا الرافزوففا

Stains, Reagents and Solutions

2.3 الصبغات والكواشف والمحاليل

Stains

1.2.3 الصبغات

Gram Stain

❖ صبغة كرام

هذه الصبغة مكونة من المحاليل الآتية (Collee et al., 1996)

- الكريستال البنفسجي Crystal violet
- محلول اليود Iodine solution
- كحول الأيثلي 95% Ethyl alcohol

Ethidium Bromide

❖ صبغة بروميد الأثيديوم

حضرت الصبغة بتركيز (10) ملغم/مل وذلك بإذابة:

- (100) ملغم من مسحوق الصبغة
- (10) مل من الماء المقطر، وحفظت في قنينة معقمة في درجة حرارة (4) °م لحين الإستعمال.

Gel Lodaing Stain

❖ صبغة التحميل لهلام الأكاروز

حضرت هذه الصبغة من المحاليل الآتية:

- % 10 SDS 1 مل
- pH=8 (0.25 M) EDTA 2 مل
- pH=8 (1 M) Tris-HCl 0.2 مل
- Bromophenol blue 10 ملغم
- (10) مل من الماء المقطر لغرض تكملة الحجم (Ahmed, 1989)

Reagents

2.2.3 الكواشف

Catalase Reagent

❖ كاشف الكتاليز

يتكون هذا الكاشف من محلول بيروكسيد الهيدروجين 3% H₂O₂ & (Barrow

Felthman, 2003)

Oxidase Reagent

❖ كاشف الأوكسديز

يتكون من:

- (1) غم من Tetramethyl –p-phenylene diamine dihydrochloride
- (100) مل من الماء المقطر المعقم (Brown, 2007)

Benedict Reagent

❖ كاشف بينديكت

يتكون من:

✓ محلول I ويتكون من: (Moore *et al.*, 1988)

- Sodium Citrate 17.3 غم من
- Na_2CO_3 10 غم من
- 80 مل من ماء مقطر معقم

✓ محلول II ويتكون من :

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.73 غم من
- 10 مل من الماء المقطر

✓ محلول III

يحضر بإضافة المحلول II الى المحلول I بهدوء ويكمل الحجم الى (100) مل بالماء

المقطر.

Solutions

3.2.3 المحاليل

❖ محلول فيتامينات وسط B5

- Nicotinic Acid 0.1 غم من حامض النيكوتينيك
- Thiamine HCl 1.0 غم من
- Pyrodoxine HCl 0.1 غم من
- 1 لتر من الماء المقطر.

Normal Saline Solution

❖ محلول الملح الفسلجي

• 0.9 غم من كلوريد الصوديوم NaCl

❖ 100 مل من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني عند PH=7.2، ثم عقت

بالمؤصدة

❖ محلول TBE (10X)

- Boric Acid 51.35 غم من
- Tric-HCl 121.1 غم من
- EDTA 3.72 غم في
- 1 لتر من الماء المقطر (Ahmed, 1989).

❖ محلول التشرب لأوراق الكروماتوكرافيا

حضر هذا المحلول المتكون من (Water: glacial acetic acid, 1-butanol) بنسبة (1:1:4) بمزج هذه المكونات بنسبة (حجم:حجم:حجم).

3.3 السلالة البكتيرية القياسية المستخدمة في الدراسة

استخدمت في هذه الدراسة سلالة البكتريا *A. tumefaciens* السلالة C58C1 ذات النمط الوراثي المعروف (rif R(pM90) وهي عزلة محورة وراثياً من مؤسسة (UGent-VIB Research Belgium) في جامعة جينسيت البلجيكية وتمتاز باحتواء بلازميداتا للجينات المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادين الحيويين الريفاميسين (Rest⁺) Rifampicine والجينتاميسين (Rest⁺) Gentamycine، وأديمت البكتريا بحفظها على وسط YEB الصلب الحاوي على 100 مايكروغرام / مل من Rif و 40 مايكروغرام/ مل من Gen (Roger et al., 2000).

4.3 عزل وتشخيص بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* من الأورام التاجية المتكونة على نباتات الآس واختبار قدرتها المرضية

1.4.3 عزل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* من الأورام التاجية

استوصلت الأورام التاجية المتكونة على سيقان نباتات الآس *Myrtus Communis* مع تجنب حصول أي قطع أو جرح فيها من حدائق جامعة الموصل/ العراق، في ما بين (تشرين الثاني 2011-شباط 2012) وجمعت في حواظ معقمة وأخذت مباشرة إلى المختبر وغسلت بالماء الجاري ساعتين لازالة التربة العالقة بها، وعقمت سطحياً بغمرها لمرتين في 96% الكحول الأثيلي لمدة (1-2) دقيقة في كل مرة، ثم غسلت (3-4) مرات بالماء المقطر المعقم ونقلت الى فلاسكات حاوية على (3%) هايبوكلورات الصوديوم NaOCl وتركت فيه 15 دقيقة، ثم غسلت بالماء المقطر عدة غسلات متتالية ثم حفظت بوضعها بين ورقتي ترشيح معقمة وزعت القطع المعقمة سطحياً بوضعها على سطح 20 مل من وسط Nutrient Agar (الجدول 1) وحفظت بدرجة حرارة (2±28) م° (48-72) ساعة للتأكد من كفاءة التعقيم السطحي لها، ثم أخذت الأورام غير الملوثة، وقطعت بالمشروط لمعقم الى قطع صغيرة ثم سحقت في (10) مل YEM السائل بالقصيب الزجاجي Glass rode المعقم باللهب الكحولي (Sorful et al., 2010).

2.4.3 عزل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* من العالق البكتيري وزراعتها

لغرض عزل بكتريا *A.tumefaciens* من العالق البكتيري حضرت تخافيف عشرية، وأخذ (0.1) مل من التخفيف الأخير ونشر على سطح وسط YEM الصلب (Vincent, 1970) للحصول على مستعمرات منفردة، وحضنت 24 ساعة بدرجة حرارة (2±28) م° ثم نقلت

كل مستعمرة من هذه المستعمرات إلى سطح وسط Agrobacterium Mannitol Medium (AM) الصلب (Murugesan *et al.*, 2010)، وحفظت على سطح الوسط الأخير المائل الصلب في قناني صغيرة Vial وحفظت بعد التحضين في الثلاجة بدرجة حرارة (4م°) لحين استعمالها، ورمز لها (AtMco1) *A.tumefaciens* نسبة للنبات الذي عزلت منه، واعدت زراعتها كل (3-4) اسابيع للتأكد من حيويتها قبل الأستعمال.

3.4.3 تشخيص بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*

1.3.4.3 الصفات الزرعفة Cultural Characteristics

انتخبست المستعمرات البكتيرية البرفة من الأورام التاجفة لنباتات الآس *Myrtus Communis* النامفة على وسط YEM على اساس شكل المستعمرات وقوامها ولونها وحجمها، وذلك بنقل المستعمرات المنفردة النامفة على وسط YEM الى وسط AM للتأكد من نموها على الوسط الأنتخابف لبكترفا الأكروبكترفوم، وحضنت الأطباق فف درجة حرارة (28±2) م° لمدة (24-48) ساعة، ونقلت المستعمرات النامفة على وسط AM الأنتخابف الى وسط أكار الماكونكف (Bopp *et al.*, 1999) وزرعت بطرففة التخطفط Streaking لغرض تنقفتها والتأكد من قابلفة البكترفا البرفة على تخمفر سكر اللاككوز من عدمه. وحضنت الأطباق فف درجة حرارة (28±2) م° لمدة (24) ساعة، ونقلت المستعمرات النامفة لغرض اختبارها على الأوساط الإنتخابفة والفف شملت. وسط (Luria Bertani Medium (LB) ووسط King Medium B ووسط (Hacene & Larry, 1987) ووسط (Subba, 1981) Glucose Peptone Agar و وسط (Murugesan *et al.*, 2010) Potato Dextrose Agar (PDA) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة (28±2) م° لمدة (24-48) ساعة لغرض اختبار قابلفة البكترفا على النمو على هذه الاوساط.

2.3.4.3 الفحص المجرف Microscopic Examination

أختبرت الخصائص الشكلفة للبكترفا البرفة بعمل مسحات منها وصبغها بصبغة كرام Gram Stain ثم فحصت بالمجر الضوئف بالعدسة الزففة بقوة تكبفر نهائف (100x) ولوحظت قابلفتها للاصطباغ وشكل الخلفا البكترففة وترتفبها ومقارنتها مع البكترفا القفاسفة *A.tumefaciens* (C58C1).

3.3.4.3 الإختبارات الكفموحفوفة Biochemical Tests

أجرفت الأختبارات الكفموحفوفة للبكترفا البرفة المعزولة من الأورام التاجفة لنباتات الآس *Myrtus Communis* طبقاً لما ورد فف Berges Manual of Determinative

Bacteriology (Holt et al., 1994; Moore et al., 1988)، مع استعمال البكتريا القياسية *A.tumefaciens* (C58C1) (عينة مقارنة)، وأهم هذه الاختبارات ما يأتي:

أولاً: الأختبارات الكيموحيوية لتشخيص البكتريا

❖ إختبار الكاتاليز Catalase Test

أجري هذا الاختبار بوضع مستعمرة فتية من البكتريا مع قطرة من المحلول الملحي الفسلي على سطح شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيفت إليها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز (3)%. ويدل تصاعد الفقاعات الغازية في ثوانٍ على قدرة البكتريا على انتاج أنزيم الكاتاليز الذي يعمل على تحطيم المركب السام بيروكسيد الهيدروجين وتحرير الأوكسجين والماء (Lenet et al., 1985).

❖ إختبار استهلاك المصادر الكربونية Carbon Utilisation Test

لقت اطباق بتري الحاوية على الوسط الاساس Basal medium المتضمن احد انواع المصادر الكربونية (Lactose ,Mannitol) بتركيز (1)% بجزء من مزرعة نقية للبكتريا ثم حضنت الاطباق في درجة (2±28) م° لمدة (7-14) يوماً، ولتحديد قدرة البكتريا على استهلاك المصادر الكربونية تمت مقارنة النمو الحاصل مع الوسط الاساس الحاوي على كلوكوز بنسبة (1)% بوصفه معاملة سيطرة موجبة والوسط الاساس غير الحاوي على مصدر كربوني بوصفه معاملة سيطرة سالبة (Williams et al., 1983).

❖ إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

لقت أنابيب وسط سترات سايمون المائل بالمستعمرات الفتية للبكتريا وحضنت بدرجة حرارة (2±28) م° (24-48) ساعة وكان تغير لون الوسط من الأخضر الى الأزرق دليلاً على استعمال البكتريا للسترات بوصفها مصدراً وحيداً للكربون وانتاج عدد من المركبات القاعدية (Holt et al., 1994).

❖ إختبار تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate Fermentation

لقت العزلات في أنابيب اختبار حاوية على وسط تخمر الكربوهيدرات وحضنت بدرجة حرارة (2±28) م° (24) ساعة، ويدل تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر على قدرة البكتريا على تخمير السكريات وانتاج الحامض من (كلوكوز، سكروز، ميليزيتوز، مالتوز) (Lenet et al., 1985).

❖ إختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد Tipple Sugar Iron Test

يعد هذا الوسط متعدد الاختبارات وذلك لاحتوائه على ثلاثة سكريات هي (كلوكوز، لاكتوز، سكروز)، ولقح وسط (TSI) بإبرة التلقيح Needle بالطعن (Staabing) للقر Butt وبشكل متعرج Zigzage للسطح المائل Slant ويحضن في درجة حرارة (2±28) م° (24) ساعة، ويشير تغير لون الوسط بكامله من اللون الأحمر إلى الأصفر إلى قدرة البكتريا على تخمير اللاكتوز والسكروز، في حين يكشف اسوداد الوسط عن توليد غاز كبريتيد الهيدروجين H₂S، يدل بقاء لون الوسط دون تغيير على عجز البكتريا عن تخمير السكريات (Holt et al., 1994).

❖ إختبار النمو بدرجات حرارة مختلفة Growth Test at Different Degrees of Temperature

تتميز البكتريا التابعة لنوع *A. tumefaciens* بقدرتها على النمو في درجات حرارة (28،35) م° وعجزها عن النمو في درجة حرارة (40) م° ، وعلى هذا الأساس لقح وسط Agrobacterium Mannitol Medium الانتخابي الصلب بمستعمرات فتية للبكتريا البرية، في حين لقح الوسط YEB بمستعمرات فتية لبكتريا القياسية (*A.tumefaciens* C58C1) وحضنت الأطباق المزروعة بدرجات حرارية مختلفة (28، 35 و 40) م° (24-48) ساعة، وعد ظهور النمو في كل درجة من هذه الدرجات نتيجة موجبة للفحص (Holt et al., 1994).

❖ إختبار النمو بدرجات مختلفة للدالة الحامضية Growth Test at Different pH Range

نقلت مستعمرة واحدة من البكتريا إلى دوارق زجاجية سعة (50) مل، وتحتوي الدوارق على وسط *Agrobacterium Mannitol Medium* و YEB على التعاقب وذات درجات مختلفة (pH=4-9) من الأس الهيدروجيني، وحضنت الدوارق في درجة حرارة (2±28) م° (24) ساعة في ظروف الظلام، ولوحظت قدرة البكتريا على النمو في درجات مختلفة من الأس الهيدروجيني من تعكر الوسط ومقارنته مع (معاملة السيطرة) السالبة (الأوساط غير الملقحة) واختلاف الكثافة الضوئية للمزرعة البكتيرية عند الطول الموجي (600) نانوميتر باستعمال المطياف الضوئي (Moore et al., 1988).

❖ اختبار غياب بعض عوامل النمو

يستدل من نمو البكتريا على الأوساط المذكورة آنفاً بغياب عدد من عوامل النمو مثل (البايونين أو الثايمين) على قدرة هذه البكتريا على النمو دون الحاجة لتوفر هذه العوامل في الوسط (Holt *et al.*, 1994).

❖ اختبار استهلاك التايروسين Tyrosine Utilization Test

لقت اطباق وسط Tyrosine Agar medium بالمستعمرات الفتية للبكتريا البرية والقياسية وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (28±2) °م ولوحظت نتائج الاختبار بعد 3 أسابيع فيدل تحلل حبيبات التايروسين واختفاؤها من الوسط على استهلاك البكتريا للتايروسين (Holt *et al.*, 1994).

❖ اختبار النمو بوجود سترات الأمونيوم الحديدية Growth at Ferric Ammonium Citrate Test

اضيفت مادة Ferric Ammonium Citrate بتركيز 0.1 مل / لتر من محلول الخزين بنسبة (0.01)% الى وسط AM من أجل اختبار قابلية البكتريا البرية المعزولة من الأورام على اكتساب الصبغة سترات الأمونيوم الحديدية من الوسط، وأجري الزرع بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات منفردة وحضنت الأطباق في درجة حرارة (28±2) °م (48) ساعة (Holt *et al.*, 1994).

ثانياً: تحديد الطراز الحيوي للبكتريا

اختبرت العزلات البكترية التي أعطت نتيجة ايجابية في احداث العدوى الاصطناعية على النباتات المختبرة، وحدد الطراز الحيوي للبكتريا بعمر (24) ساعة وفقاً لمدى تطابق الأختبارات الكيموحيوية المحددة لتحديد الطرز الحيوية المختلفة لانواع *Agrobacterium spp* (Weller *et al.*, 2004; Hacene & Larry, 1987; Moore *et al.*, 1988). والتي شملت الأختبارات الآتية:

❖ اختبار أنزيم الأوكسيداز Oxidase Test

أجري هذا الاختبار بنقل مستعمرة فتية من البكتريا إلى سطح ورقة الترشيح المشبعة بكاشف الأوكسيداز المحضر في الفقرة (2.2.3) ويدل ظهور اللون البنفسجي في عدة ثوانٍ على قدرة البكتريا على انتاج انزيم Cytochrome Oxidase (Holt *et al.*, 1994).

❖ إختبار تحمل البكتريا لتراكيز مختلفة من ملح الطعام NaCl

لقحت أطباق وسط ألكار المغذي الحاوي على تراكيز مختلفة من ملح الطعام (1%)، NaCl (2%) بمستعمرات فنية من البكتريا وحضنت في درجة حرارة (28±2) م° (7) أيام، ويدل ظهور نمو البكتريا عند التراكيز المعنية على تحملها لهذه التراكيز من ملح الطعام (Holt et al., 1994).

❖ إختبار انتاج 3-كينولأكتوز 3-Ketolactose Production Test

لقحت أطباق وسط ألكار اللاكتوز بمستعمرة فنية بقطر (5) ملم من البكتريا وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (28±2) م° (48) ساعة، ثم غمرت الأطباق بمحلول Benddict's reagent، ويستدل على انتاج الكبتريا للـ 3-Ketolactose من تكون حلقة صفراء بقطر (2-3) سم حول المستعمرات النامية التابعة لـ Biovar I (Holt et al., 1994).

❖ إختبار Differential Acid Production Assay

لقحت أطباق وسط PDA-CaCO₃ بمستعمرات فنية للبكتريا وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (28±2) م° (48-72) ساعة في ظروف الظلام، ويدل ظهور حلقة غامقة (غير شفافة) حول المستعمرات النامية على انها تابعة للـ Biovar I, Biovar III، في حين يدل ظهور حلقة شفافة حول المستعمرات النامية على انها تابعة للـ Biovar II (Bouzar & Jones, 1992).

❖ إختبار الحركة عند pH (7.0)

نقلت مستعمرة صغيرة واحدة من البكتريا بآبرة التلقيح Needle وذلك بطعن Staabing وسط الحركة Motility test medium إلى المركز، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (28±2) م° (48) ساعة، ويدل انتشار هالة النمو وسعتها على ان البكتريا المزروعة متحركة عند pH (7.0) (Moore et al., 1988).

4.3.4.3 تحضير اللقاحات البكتيرية وتقدير كثافته طيفياً

❖ تحضير اللقاح البكتيري

حضر اللقاح بنقل حملة لوب واحدة من البكتريا القياسية (C58C1) *A.tumefaciens* النامية على وسط YEB الصلب والبكتريا البرية (*AtMcOI*) *A.tumefaciens* النامية على وسط AM الصلب و *S.meliloti* النامية على وسط YEM الصلب إلى دورق زجاجي سعة 125 مل يحتوي 25 مل من وسط YEB، AM و YEM على التوالي مضافاً إليه

Refampicin و Gentamycin بتركيز 100 و 40 مايكروغرام/مل الى وسط YEB والـ Refampicin بتركيز 250 مايكروغرام/ مل إلى وسط AM، وحضنت العينات في الحاضنة الهزازة ، في ظروف ظلام تام بدرجة حرارة (2±28) °م (24-48) ساعة بسرعة دوران 150rpm. وحصدت البكتريا بجهاز الطرد المركزي المبرد (15) دقيقة بسرعة (1500) دورة /دقيقة ، واستبعد الراشح واضيف واحد مل من وسط YEB و AM الى البكتريا القياسية والبرية المترسبة على التوالي للحصول على اللقاح البكتري. واخذت 1.5 مل لكل مزرعة من المزارع السائلة في انابيب ابندروف والاخرى تحتوي 1.5 مل من الاوساط YEB, YEM, AM السائلة في انابيب ابندروف الاخرى، وقيست الكثافة الضوئية Optical Density لهذه العينات في طول موجي 600 نانوميتر بالمطياف الضوئي وقد تراوحت الكثافة الضوئية لبكتريا *A. tumefaciens* ما بين (1.5-1.8) و (1.0-1.3) لبكتريا *S. meliloti*، واجريت عمليات التخفيف الى كثافات ضوئية مناسبة حسب متطلبات التجارب فيما يخص بكتريا *A. tumefaciens* البرية والقياسية للوصول الى الكثافات الضوئية (OD) Optical Density للمزارع التي تراوحت ما بين (0.1-1.5) في الطول الموجي 600 نانوميتر.

5.3.4.3 حفظ مزارع البكتريا في محلول الكليسرول

اخذ حجم واحد من كل مزرعة بكتيرية سائلة ومنتشطة في انابيب ابندروف واضيف اليها الحجم نفسه من محلول الكليسرول 25% المعقم ومزجت بمزج كهربائي Vortex خمس دقائق، وحفظت الانابيب في درجة حرارة -80°م (Miller, 1987).

6.3.4.2 دراسة القدرة المرضية للبكتريا على اصابة النباتات وتكوين الأورام التاجية لها أولاً: إختبار القدرة المرضية على إصابة البادرات

اختبرت القدرة المرضية للبكتريا بإجراء العدوى الأصطناعية على بادرات الطماطة *Lycopersicon esculentum*، وبادرات زهرة الشمس *Helianthus annuus* (Fure- Chyi et al., 1999; Tarbah & Goodman, 1986) وذلك بقطع المجموع الجذري لهذه البادرات ثم وخزها في منطقة السيقان تحت الفلجية لكل بادرة بسرنج دقيق ملوث بلقاح البكتريا وذلك لضمان وصول البكتريا الى داخل النسيج للقطعة النباتية، وجففت هذه البادرات من عالق البكتريا بوضعها على سطح ورق الترشيح المعقم، ثم غرست بصورة قائمة على سطح الوسط الزراعي 1/2 WP (Lloyd & McCown, 1980) بمعدل (1 بادرة/قنينة)، ووضعت العينات في الحاضنة بظروف درجة حرارة (2±25) °م و(16 ساعة ضوء، 8 ساعات ظلام) وشدة إضاءة تتراوح بين (700-1000) لوكس، ولقحت عينات المقارنة السالبة بوخز البادرات بسرنجة

مغمورة في ماء مقطر معقم وبالطريقة عينها وحفظت في الظروف نفسها، وأخذت القراءة بعد شهر تقريباً (Tarbah & Goodman, 1986).

ثانياً: إختبار القدرة الأمراضية على إصابة اقراص الجزر والبطاطا

❖ إصابة أقراص الجزر Carrot Discs

استعملت عينات الجزر *Daucas Carota* التي حصل عليها من السوق المحلية لمدينة الموصل، وغسلت بالماء الجاري Tap Water للتخلص من التراب العالق، ثم عقت بمغمرها مرتين في محلول (70%) الكحول الأيثلي (1-2) دقيقة، وغسلت بالماء المقطر المعقم (3-4) مرات ونقلت الى قناني زجاجية بحجم (250) مل حاوية على 3% هابيوكلورات الصوديوم NaOCl (10) دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم (3-4) مرات دقيقة لكل مرة، وقطعت على شكل أقراص وحقت باللقاح البكتيري، ثم وضعت على سطح الوسط (Water Agar Plates)، وحضنت في ظروف الأضاءة (16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام)، وتم ولوحظت التجربة بعد (21) يوماً للتحري عن تكوين الأورام الصغيرة على سطح هذه الاقراص (Chen et al., 1999; Aysan & Sahin., 2003).

❖ إصابة أقراص البطاطا Potato Discs BioAssay

استعملت درنات البطاطا *Solanum tuberosum* من الأسواق المحلية لمدينة الموصل، وعقت ولقحت بالبكتريا وذلك بحسب الطريقة الواردة في الفقرة السابقة، ولوحظت نتائج التجربة بعد (21) يوماً للتحري عن تكوين الأورام الصغيرة على اقراص البطاطا، ومقارنتها مع عينات المقارنة السالبة (التلقيح بالماء المقطر) (Chen et al., 1999; Aysan & Sahin., 2003).

5.3 عزل بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنباتات الجت وتشخيصها

1.5.3 عزل بكتريا *Sinorhizobium meliloti*

عزلت بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية المتكونة على نباتات الجت المزروعة في منطقتين من محافظة نينوى وهي (البيت السلبي في كلية التربية/جامعة الموصل) ومزرعة تابعة لمنطقة حاوي الكنيسة. إذ استؤصلت العقد الجذرية المتكونة على الأصناف الأربعة من نباتات الجت *Medicago sativa* (الصنف العراقي و البلجيكي والباكستاني والأمريكي)، وغسلت هذه العقد عدة مرات بالماء الجاري للتخلص من التراب العالق بها وعقت بالطريقة المذكورة في الفقرة (1.4.3)، ثم زرعت على سطح وسط N.Agar لاختبار

كفاءة التعقيم السطحي لها وحضنت (48) ساعة، ثم سحقت العقد المعقمة في (10) مل من وسط YEM السائل بالقضيب الزجاجي المعقم باللهب الكحولي، ثم نقل من هذا العالق حملة لوب الى سطح وسط YEM الصلب وزرعت بطريقة التخطيط للحصول على المستعمرات البرية المنفردة، وبعد التحضين في الظروف المذكورة سابقاً في الفقرة (2.4.3)، نقلت مستعمرة واحدة من المستعمرات البرية الى سطح وسط YEM المائل الصلب في قناني صغيرة Vial وحفظت في الثلاجة (4°م) لحين استعمالها، وثم إعادة زرعها كل (3-4) أسابيع للتأكد من حيويتها قبل الاستعمال، واعطيت الرموز للعزلات البرية كما في الجدول (3).

الجدول (3) عزلات الرايزوبيوم البرية من العقد الجذرية لاصناف نباتات الجت ومصادرها

المصدر	طبيعتها	رمز العزلة	نوع البكتريا
الصنف العراقي	Wild Type	(Rh1)	<i>S. meliloti</i>
الصنف البلجيكي	Wild Type	(Rh2)	<i>S. meliloti</i>
الصنف الباكستاني	Wild Type	(Rh3)	<i>S. meliloti</i>
الصنف الأمريكي	Wild Type	(Rh4)	<i>S. meliloti</i>

2.5.3 تشخيص بكتريا *Sinorhizobium meliloti*

1.2.5.3 الفحص المجهرى Microscopic Examination

اختبرت الخصائص الشكلية لبكتريا *S. meliloti* البرية من العقد الجذرية لنباتات الجت بإصنافه الأربعة، وذلك بعمل مسحات منها وصبغها بصبغة كرام Gram Stain ثم فحصت بالمجهر الضوئي باستعمال العدسة الزيتية بقوة تكبير نهائي X (100) ولوحظت قابليتها للإصطباغ وشكل الخلايا البكتيرية وترتيبها ومقارنتها مع العينات القياسية.

3.5.3 الإختبارات الكيموحيوية

❖ إختبار انتاج كلوكانات β (3-1) الحلقية (1-3) β Production of Cyclic β (1-3) Glucans Test (Swamynathan *et al.*, 1995)

زرعت العزلات الأربعة المراد اختبارها بطريقة التخطيط على وسط YEM الصلب الحاوي على 0.02% من صبغة الأنيلين الزرقاء Aniline blue وحضنت الأطباق عند درجة الحرارة (28±2) °م (48) ساعة، ويدل امتصاص خلايا الرايزوبيوم للصبغة على قابلية هذه البكتريا على انتاج كلوكانات β (3-1) الحلقية.

❖ **إختبار انتاج لبيفات السليلوز β (1-2) الحلقية Production of Cellulose Microfibrils β (1-2) Test** (Swamynathan *et al.*, 1995)

لقت اطباق YEM الصلب الحاوية على صبغة Congo red بتركيز (0.0025)% من محلول الخزين بتركيز 0.01% بالعزلات الأربع من الرايزوبيوم من أجل اختبار هذه العزلات على انتاج لبيفات السليلوز (1-2) β ، وزرعت الأطباق بالتخطيط وحضنت في درجة حرارة (2±28) م° (48) ساعة، وتشير ظاهرة امتصاص بكتريا الرايزوبيوم لصبغة Congo red الى قدرة هذه البكتريا على انتاج لبيفات السليلوز .

❖ **إختبار الحركة** (Swamynathan *et al.*, 1995)

اجري هذا الأختبار على عزلات الرايزوبيوم البرية من الإصناف الأربعة لنباتات الجت وذلك بعمل مسحة من المزرعة البكتيرية على وسط TY شبه الصلب والحاوي على 0.3% أكار ، وحضنت الأطباق في درجة حرارة (2±28) م° (18-24) ساعة. ثم قيس معدل قطر هالة الإنتشار لكل عزلة بوحدة المليمتر .
فضلاً عن ذلك اجريت مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية وبالطريقة نفسها الوارد ذكرها في الفقرة (3.3.4.3) للبكتريا البرية من الاورام التاجية وهي:

❖ **اختبار النمو على وسط TSI**

❖ **اختبار تحمل الملوحة**

❖ **اختبار استهلاك السترات**

❖ **اختبار انتاج الكتاليز**

❖ **اختبار انتاج الأوكسديز**

❖ **اختبار تخمر الكاربوهيدرات**

❖ **اختبار الفلورة**

❖ **اختبار انتاج 3-Ketolactose Production**

علما ان هذه الاختبارات قد اجريت وفق ما ذكر في الفقرة (3.3.4.3) من مواد العمل وطرائقه.

4.5.2 **اختبار قابلية العزلات المختلفة من بكتريا *S.meliloti* على تكوين العقد الجذرية**

المثبتة للنتروجين على بادرات الجت *Medicago sativa*

1.4.5.3 **مصدر البذور**

حصل على بذور الاصناف الأربعة من الجت (العراقي و البلجيكي و الباكستاني والامريكي) من الأسواق المحلية.

2.4.5.3 التعقيم السطحي لبذور الجت

غسلت البذور بالماء ثم عقت سطحياً بغمرها في محلول 2% هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري المخفف) لمدد غمر مختلفة (5 و 10 و 15) دقيقة وبعدها غسلت بالماء المعقم جيداً لازالة آثار المعقم. ووضعت البذور الملقحة على ورق ترشيع معقم لازالة الماء الفائض العالق بها (القصيمي، 2006).

3.4.5.3 انبات بذور الجت في الوسط الغذائي والحصول على البادرات الملقحة

زرعت البذور المعقمة بأصنافها الأربعة المستعملة لأغراض تكوين العقد الجذرية والملقحة ببكتريا *S.meliloti* والبكتريا الناتجة من الأقتران سطحياً على سطح 25 مل من وسط NF الصلب خال من النتروجين (Fahraeus, 1957) في أطباق بلاستيكية قطر (15) سم (Sterilin, U.K.) بواقع 100 بذرة/ طبق موزعة على سطح الوسط، وغلقت الأطباق بالبارافلم جميعاً وحفظت في حاضنة النمو في درجة حرارة (2±25) °م (24) ساعة في الظلام التام، وبعد إنباتها نقلت الى غرفة النمو وفي نظام الأضاءة والظلام التعاقبي (16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس (الملاح والبرهاوي، 2000)، في حين زرعت البذور المستعملة في التجارب اللاحقة او لغرض التلقيح ببكتريا *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً في قناني زجاجية حجم (250) مل تحتوي كل منها على (50) مل من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو، ونقلت العينات الى غرفة النمو بدرجة حرارة (2±25) °م وظروف ظلام في اليومين الأولين وبعد انباتها نقلت الى ظروف الضوء والظلام المتعاقبين، (16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس.

4.4.5.3 إختبار التخصص العائلي لعزلات بكتريا *S.meliloti*

لقت بادرات الجت باصنافه الأربعة (العراقي و البلجيكي و الباكستاني و الأمريكي) المعقمة الناتجة من البذور بعمر (48) ساعة والنامية على وسط NF الصلب والحاوية على مجموعة جيدة من الشعيرات الجذرية، وذلك بغمر مجموعها الجذري في 5 مل من لقاح بكتريا *Sinorhizobium meliloti* البرية من الصنف نفسه، (15) دقيقة وذلك بتلقيح بادرات الجت العراقي ببكتريا *S. meliloti* البرية من نباتات الجت *M.sativa* (العراقي النامية في الحقل) ولقت بادرات الجت البلجيكي ببكتريا *S. meliloti* البرية من نباتات الجت البلجيكي، ولقت بادرات الجت الباكستاني ببكتريا *S. meliloti* البرية من نباتات الجت الباكستاني، في حين لقت بادرات الجت الأمريكي ببكتريا *S. meliloti* البرية من نباتات الجت الأمريكي 15 دقيقة، ونقلت البادرات الملقحة الى سطح 20 مل من وسط NF الصلب في أطباق بتري زجاجية قطرها

9 سم، ورتبت البادرات الملقحة وغير الملقحة (عينة المقارنة) في صف واحد بمعدل (3-4 بادرات/طبق) ، وغلفت الأطباق بالبارافيلم وحفظت عمودياً في حاضنة النمو في درجة حرارة $(25 \pm 2)^\circ \text{C}$ وظروف 16 ساعة ضوء / 8 ساعات ظلام و شدة إضاءة 2000 لوكس.

1.4.4.5.3 إعادة عزل بكتريا *S. meliloti* من العقد الجذرية المتكونة على جذور نباتات الجت

فصلت العقد الجذرية مع جزء من الجذر المتكون على المجموع الجذري للأصناف الأربعة لنباتات الجت الملقحة بعزلات البكتريا البرية من العقد المتكونة على جذورها في الحقل *S. meliloti*، وذلك بعد أربعة أسابيع من تاريخ تلقیح البادرات مختبرياً، ونقلت الى أطباق بتري معقمة حاوية على ورق ترشيح للتخلص من الماء العالق بها، وسحقت هذه العقد في 1 مل من وسط YEM السائل باستعمال Glass rod المعقم باللهب الكحولي للحصول على المعلق البكتيري، ثم زرعت على سطح وسط YEM الصلب بطريقة التخطيط للحصول على المستعمرات البرية المنفردة وحضنت الأطباق بدرجة حرارة $(28 \pm 2)^\circ \text{C}$ ، وحفظت الأطباق في ظروف 4°C في الثلاجة لاستعمالها في التجارب المختبرية.

2.4.4.5.3 تلقیح الشعيرات الجذرية لبادرات الأصناف الأربعة من نباتات الجت ببكتريا الـ *S. meliloti* البرية من العقد الجذرية المتكونة عليها وبشكل متبادل

لقت بادرات الجت المعقمة بأصنافه الأربعة (العراقي و البلجيكي و الأمريكي والباكستاني) بعمر 48 ساعة والتي نمت على سطح وسط NF الصلب والحاوية على مجموعة جيدة من الشعيرات الجذرية بغمر مجموعها الجذري في 2 مل من لقاح بكتريا *S. meliloti* المعلق بمحلول 6 % ماننول والبرية من العقد الجذرية لنباتات الجت العراقي *M.sativa* وبمعدل 30 بادرة/ معاملة 15 دقيقة، وبعدها نقلت الى سطح 20 مل من وسط NF الصلب في أطباق بتري زجاجية قطرها 9 سم وبمعدل 3-4 بادرات/ طبق، وسدت الأطباق بإغطيتها وغلفت بالبارافيلم وحفظت عمودياً في غرفة الزرع وتحت الظروف المشار إليها مسبقاً.

وكررت هذه المعاملة مع تلقیح الاصناف الأربعة أيضاً بعالق بكتريا *S. meliloti* البرية من العقد الجذرية لنباتات الجت (البلجيكي و الباكستاني و الأمريكي) وذلك لمعرفة قابلية البكتريا على إصابة بادرات الجت التابعة للأصناف البرية منها ومقارنتها مع قابلية البكتريا على إصابة بادرات الجت من الصنف البرية منه.

3.4.4.5.3 فحص المجموع الجذري للبادرات بالمجهر الضوئي وتصويرها

فحصت الشعيرات الجذرية السليمة (غير المشوهة) لبادرات الجت غير الملقحة والمشوهة في البادرات الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (الفقرة 2.4.4.5.3)، والنامية في وسط NF الصلب بالمجهر الضوئي المركب، ثم صورت جميع العينات بالكاميرا الرقمية.

4.4.4.5.3 تقدير المحتوى البروتيني

تم تقدير محتوى البروتين بحسب طريقة (Lowry et al., 1951) والتي حورها (Schacterle & Pollack, 1973) لتقدير الكميات الدقيقة من البروتين وتتضمن الطريقة تفاعل البروتين مع كاشف فولن ليعطي معقداً أزرق اللون نتيجة لتفاعل التريتوفان والتايروسين مع حامض فوسفومولبيدنتنكستيك وتقرأ الأمتصاصية بجهاز Spectrophotometer عند طول موجي (650) نانوميتر اذ تتناسب شدة الأمتصاصية مع تركيز اللون، واستعمل البومين مصل البقر Bovine Serum Albumin محلولاً قياسيًّا،

❖ تحضير الكواشف

تم تحضير ثلاثة محاليل استخدمت في تقدير البروتين

1- محلول كبريتات النحاس المائية القاعدية $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

أذيب (2) غم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH في حجم من الماء المقطر باستعمال المحرك المغناطيسي للحصول على محلول متجانس، ثم أخذ (10) غم كاربونات الصوديوم $NaCO_3$ و (0.05) غم كبريتات النحاس المائية $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ و (0.1) غم Sodium Potassium Tartarat، وأذيب كل منها في حجم مناسب من الماء المقطر مع التسخين والتحرك المستمر لاذابة كاربونات الصوديوم، ثم مزجت جميع المحاليل ووضعت في قنينة حجمية سعة 100 مل وأكمل الحجم النهائي بالماء المقطر.

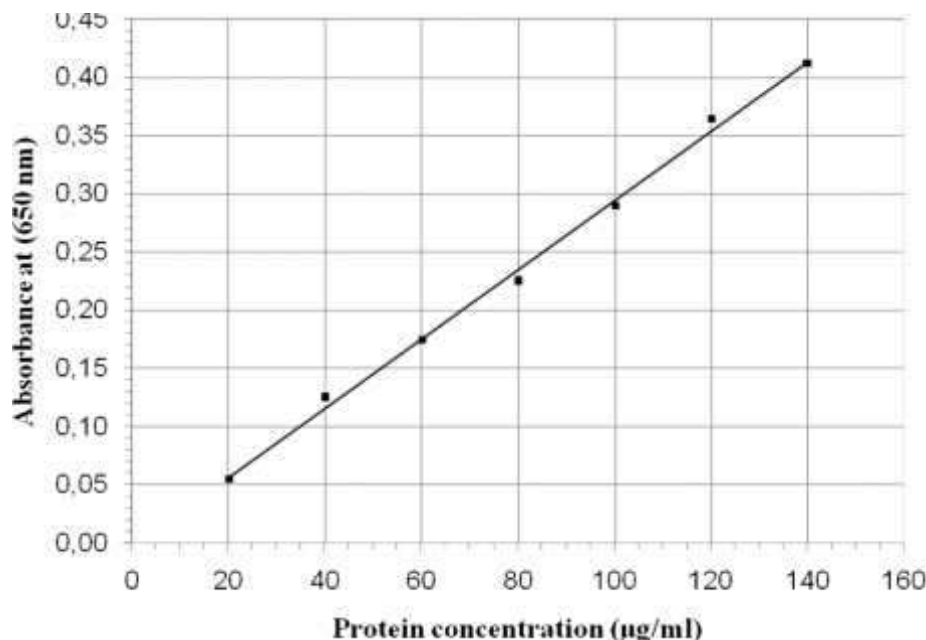
2- محلول كاشف فولن Folin Reagent

حضر 1 عياري منه وذلك بإضافة (0.5) مل من كاشف فولن الجاهز (2) عياري لكل أربعة مللترات من الماء المقطر، واستعمل لتقدير كمية البروتينات في العينات (بادرات الجت الملقحة بالرايزوبيوم والمقترنة)

3- محلول البومين مصل البقر القياسي Bovine Serum Albumin Solution

حضر هذا المحلول بإذابة (100) ملغم من BSA في (100) مل ماء مقطر وقرئت كثافة المحلول بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي (280) نانوميتر ويجب ان تكون القراءة (0.67) فإن كانت أقل من ذلك يضاف (BSA) إلى المحلول إلى ان تصل القراءة

(0.67) وإن تجاوزت ذلك تعدل القراءة بإضافة الماء المقطر. ولتحضير المنحني القياسي للبروتين، استخدمت تراكيز مختلفة من المحلول القياسي للبروتين تراوحت ما بين (0-140) مايكروغرام/مل، الشكل (6).



الشكل (6) المنحني القياسي للبروتين

❖ تقدير محتوى البروتين في العينات النباتية

قدر المحتوى البروتيني لبادرات الجت غير الملقحة والملقحة ببكتريا بعزلات *S. meliloti* البرية من الأصناف الأربعة للجت (العراقي و البلجيكي و الباكستاني و الأمريكي) والبكتريا المقترنة، إذ أخذ (1) غم من الأفرع الخضرية للبادرات الملقحة وسحق في هاون خزفي يحتوي على (5) مل من محلول ثالث كلوريد حامض الخليك Tri chloro acetic acid، ووضعت العينات في قناني زجاجية حجم (100) مل في حمام ثلجي ثم وضعت في الحاضنة الهزازة بسرعة (100) دورة / دقيقة لمدة ساعة واحدة ثم حصدت بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة (5000) دورة/دقيقة لمدة خمسة دقائق ويهمل الراشح ويغسل الراسب المتبقي (5) مرات باستعمال محلول (5) % من TCA مع إعادة الترسيب في كل مرة بالظروف السابقة نفسها، ثم اضيف الى الراسب (10) مل من محلول (1) عياري هيدروكسيد الصوديوم ومزج جيداً ووضع في الحاضنة الهزازة لمدة (24) ساعة، ثم حصد بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة (3000) دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق ثم يؤخذ الراشح ويكمل حجمه إلى (10) مل بالـNaOH.

حددت كمية البروتين الكلي المستخلص بأخذ (0.1 مل من العينة + 0.9 مل ماء مقطر) واضيف اليه (1 مل) من كاشف النحاس القاعدي ثم تركت الانابيب (10) دقائق في درجة حرارة الغرفة ، ثم اضيف اليه (4) مل من كاشف فولن ، ورجت الانابيب جيدا ثم وضعت في حمام مائي في درجة حرارة (55) °م (5) دقائق ، وبعد ذلك تركت الانابيب لكي تبرد الى درجة حرارة الغرفة، وبعدها قرئت الامتصاصية عند طول موجي (650) نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي، ورسم المنحني القياسي للبروتين المستعمل لاحقا في تقدير كمية البروتين للعينات، اذ يتم تسقيط الامتصاصية للعينات النباتية وبالطريقة الوارد ذكرها آنفا على المنحني القياسي له، ومن ثم تطبيق القانون الآتي لتحويل كمية البروتين من المايكروغرام/مل إلى المليغرام/غرام

$$\text{التركيز (ملغم/غرام)} = \frac{\text{التركيز} * \text{الحجم القياسي}}{100}$$

6.3 التحول الوراثي في البكتريا بطريقة الأفتران

1.6.3 اختبارات حساسية للمضادات الحيوية

إختبرت حساسية الأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة الحالية لمجموعة المضادات الحيوية بالإعتماد الأختبارات القياسية لذلك، حيث أخذت مجموعة أطباق بتري بلاستيكية قطرها 9.0 سم وأضيف في كل منها 15 مل من وسط AM الفقرة (2.1.3) بدرجة حرارة (45-50) °م المحفوظ في حمام مائي بإضافة المضادات الحيوية والتي تم الحصول عليها من الشركة العامة لصناعة الادوية (سامراء /العراق) وشركة (Torge-Hamburg (Germany) وبالتراكيز المثبتة في الجدول(4)، تركت الأطباق مفتوحة لحين تصلبها، أعقبه تلقيح الوسط بنشر 0.1 مل من المعلق البكتيري (*A.tumefaciens* (AtMcol) الفتى، وضعت العينات الملقحة في الحاضنة بدرجة حرارة (28) °م في ظروف الظلام (24-48) ساعة، بعدئذٍ فحصت العينات للتعرف على الأستجابة التي تبديها البكتريا تجاه المضادات الحيوية قيد الأختبار (Soriful et al., 2010)، واختبرت بقية المضادات الحيوية باعتماد الطريقة المشار إليها أعلاه مع الأخذ بنظر الأعتبار المحافظة على التراكيز النهائية لها، اعتمدت الخطوات نفسها المتبعة سابقاً باستعمال وسط YEB مع بكتريا *A.tumefaciens* (C58C1) ووسط YEM مع بكتريا *S. meliloti* واستخدمت معها تراكيز المضادات الحيوية وحسب ما ثبت في الجدول (4) وبالتراكيز النهائية الخاصة بكل بكتريا.

الجدول (4) المضادات الحيوية المستعملة ورموزها وتراكيزها الخزينة والنهائية ومذيباتها

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز الخزين (mg/ml)	التركيز النهائي (µg/ml)	المذيب
Ampicillin	Amp	5	10	ماء مقطر معقم
Amoxicillin	Amo	5	25	إيثانول 70 %
Cefotaxime	Cef	5	30	إيثانول 70 %
Gentamycin	Gen	40	40	سائل
Tetracycline	Tet	5	30	إيثانول 70 %
Trimthprim	Tri	5	30	إيثانول 70 %
Erthromycin	Ery	10	15	كحول مطلق
Rifampicin	Rif	30	100*	ميثانول
			250*	
Streptomycin	Str	50	25	ماء مقطر معقم
Chloramphenicol	Chl	35	35	كحول مطلق
Ciprodar	Cip	20	30	ماء مقطر معقم
Kanamycin	Kan	30	30	ماء مقطر معقم

* استعمال التركيز 100 مايكروغرام/مل مع البكتريا القياسية

** استعمال التركيز 250 مايكروغرام/مل مع البكتريا البرية

2.6.3 تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لبكتريا *S. meliloti* و *A. tumefaciens*

البرية والمحولة وراثيا

1.2.6.3 التحييد التلقائي Spontaneous Curing

استعملت طريقة (Meyer, 1974) اذ لقع (5) مل من وسط (YEM, AM, YEB) السائل بمستعمرة منفردة من بكتريا (*A. tumefaciens* (C58C1) و (*A. tumefaciens* (AtMcol) و *S. meliloti* على التعاقب ثم حضنت الاوساط في درجة حرارة $(2 \pm 28)^\circ\text{C}$ (24) ساعة ، وحضرت تخافيف عشرية للمزارع البكتيرية واخذ 0.1 مل من التخافيف الثلاثة الاخيرة ونشرت على الاوساط الثلاثة المذكورة آنفاً بناشر زجاجي معقم، وحضنت الاطباق في درجة حرارة $(2 \pm 28)^\circ\text{C}$ (24) ساعة ، ثم حضر منها الطبق الرئيس (Master Plate) وذلك بنقل 100 مستعمرة بصورة منفردة وعشوائية الى الاوساط الغذائية السابقة الذكر وحضنت في درجة حرارة $(2 \pm 28)^\circ\text{C}$ (24) ساعة ، ثم اختبرت المستعمرات البكتيرية النامية على عدة اوساط غذائية حاوية على المضادات الحيوية المختلفة كل على حدة، وسجلت النتائج لعدد المستعمرات الفاقدة للمقاومة ، ثم حسبت النسبة المئوية للتحديد.

2.2.6.3 التحديد المستحث للبلازميدات باستعمال صبغة الأكردين البرتقالي Acridine Orange

اتبعت الطريقة القياسية (Tomoeda et al., 1974)، ثم حدد التركيز المميت Lethal concentration من الأكردين البرتقالي في بكتريا *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً، وبكتريا *S.meliloti*. بتلقيح (5) مل من وسطي YEB و AM الحاويين على التراكيز النهائية للمضادين الحيويين Rifampicin (100) مايكروغرام/مل و Gen (40) مايكروغرام/مل لبكتريا *A.tumefaciens* (C58C1) و *A.tumefaciens* (AtMcol) و (5) مل من وسط YEM السائل لبكتريا *S.meliloti* وحضنت بدرجة حرارة (2±28)°م (24) ساعة، ونقل 0.1 مل من هذه المعلقات الى قناني حجم 25 مل حاوية على 10 مل من أوساط AM، YEM، YEM الحاوية على الأكردين البرتقالي بالتراكيز (250 و 500 و 750 و 1000) مايكروغرام/مل لبكتريا *A.tumefaciens* بالتراكيز (25 و 50 و 75 و 100) مايكروغرام/مل لتحديد بلازميد بكتريا *S.meliloti* وبعد انتهاء التحضين عد التركيز مميتاً حين لم يلاحظ أي نمو في المزارع الجرثومية، إذ استعمل نصف التركيز المميت لتحديد البكتريا.

وبعد التعرف على التركيز المميت لقحت (10) مل الأوساط المذكورة آنفاً الخاصة ببكتريا *A.tumefaciens*, *S.meliloti* البرية والمحولة وراثياً بمستعمرة منفردة من كل نوع من الأنواع البكتيرية المذكورة، وحضنت الأوساط بدرجة حرارة (2±28)°م (24) ساعة، وفي اليوم الثاني أخذ 0.1 مل من التخفيف السابع لبكتريا *A.tumefaciens* والتخفيف التاسع لبكتريا *S.meliloti*، وأضيف الى (5) مل من الأوساط YEB, AM, YEM الحاوية على الأكردين البرتقالي بتركيز (500) مايكروغرام/مل لبكتريا *A.tumefaciens* و (50) مايكروغرام/مل لبكتريا *S.meliloti* وحضنت الأوساط بدرجة حرارة (2±28)°م (24) ساعة، وحضرت عدة تخافيف عشرية للمزرعة البكتيرية واخذ 0.1 مل من التخافيف الثلاثة الأخيرة ونشرت على أطباق الأوساط المذكورة وحضنت بدرجة حرارة (2±28)°م (24) ساعة. وحضر الطبق الرئيس Master Plate ، وحضنت بدرجة حرارة (2±28)°م 24 ساعة، ثم نقلت إلى اوساط غذائية حاوية على المضادات الحيوية (Amo, Amp) كل على حدة، وسجل عدد المستعمرات الجرثومية الفاقدة للمقاومة ثم حسبت النسبة المئوية للتحديد.

3.2.6.3 تلقيح الشعيرات الجذرية لبادرات الجت بـ *S.meliloti* المحيدة

لقت بادرات الجت (الصنف العراقي) بعمر (48) ساعة بـ *S.meliloti* المشفاة بطريقة التلقيح المذكورة في الفقرة نفسها (4.4.5.3) ونقلت البادرات الملقحة الى سطح 20 مل من وسط NF الصلب في اطباق بتري زجاجية قطر (9) سم ، ورتبت البادرات بمعدل 4/3 بادرات /طبق بشكل متوازي، وحفظت الاطباق بعد تغليفها بالبارافيلم عمودياً بالظروف نفسها المشار اليها سابقاً.

4.2.6.3 تلقيح العائل النباتي بـ *A. tumefaciens* المحيدة

لقت بادرات الجت (الصنف العراقي) والسيقان تحت الفلجية المستأصلة منه بـ *A.tumefaciens* (AtMcol), *A.tumefaciens* (C58C1) المشفاة بطريقة التلقيح والتحصين نفسها الواردة في الفقرة (1.2.8.3).

3.6.3 قابلية محتوى DNA البلازميدي في بكتريا *S.meliloti* وبكتريا *A.tumefaciens* على الحركة والانتقال بالاقتران.

لاجل الكشف عن قابلية DNA البلازميدي في الأجناس البكتيرية قيد الدراسة على الحركة والانتقال ما بين *S.meliloti* و *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً أُجري الإقتران وذلك بعد إجراء عملية تحييد DNA البلازميدي للبكتريا المستلمة *S. meliloti* و *A.tumefaciens* ، بشكل متعاقب ومتبادل. اذ اجريت عملية الاقتران بين الانواع المختلفة من البكتريا كما في الجدول (5) واستعمل الاختلاف في الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية علميتين وراثيتين بين البكتريا الواهة والمستلمة، واجري الاقتران بحسب طريقة (Decre et al, 2002; Olsen et al, 1992) وكالآتي:

الجدول (5) اجناس البكتريا المستعملة في تجارب الإقتران وأوساطها وعلائمها الوراثية

الوسط الغذائي	البكتريا الواهة	المقاومة للمضادات الحيوية	الحساسية للمضادات الحيوية	البكتريا المستلمة	الوسط	المقاومة	الحساسية
AM	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)	Rif	Cef	<i>S.meliloti</i>	YEM	Cef	Rif
YEB	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)	Rif	Cef	<i>S.meliloti</i>	YEM	Cef	Rif
YEM	<i>S.meliloti</i>	Chlo	Tri	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)	AM	Tri	Chlo
YEM	<i>S.meliloti</i>	Chlo	Tri	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)	YEB	Tri	Chlo

1.3.6.3 إعداد المعلقات البكتيرية وتحضيرها

جهاز معلق بكتريا (*A.tumefaciens* (AtMcol) في وسط AM و معلق بكتريا *A.tumefaciens* (C58C1) في وسط YEB السائل وحضر معلق بكتريا *S.meliloti* في وسط YEM السائل (4.3.4.3)، بمزج حملة لوب من كل بكتريا مع 10 مل من الوسط السائل الملائم لها. وحضنت في الحاضنة الهزازة بظروف (2±28)°م (24) ساعة في ظروف الظلام.

2.3.6.3 إحداث الأقتران بين *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (الواهبة) و *S.mililoti* (المستلمة)

- أجريت عملية إعادة الزرع بأخذ 0.1 مل من المزرعة البكتيرية وتلقيح 10 مل من الوسط (4-5) ساعات للحصول الى الطور اللوغاريتمي الذي بلغت الكثافة الضوئية فيه 1-1.5 عند الطول الموجي 600 نانوميتر.

- مزج 0.1 مل من معلق كل من بكتريا *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً في مع 0.1 مل من معلق بكتريا *S.meliloti* المشفاة في أنبوية اختبار حجم 5 مل وأضيف اليهما 1 مل من وسط YEM السائل وأعيد تحضير المزيج نفسه باستعمال وسطي AM, YEB.

- غلقت الأنبوبتان وحضنت في الحاضنة بظروف (2±28)°م (3) ساعات في الظلام، حضرت تخافيف عشرية من العالق ولغاية (10⁻⁷).

- بعدها أخذ 0.1 مل من كل تخفيف لمزيجي الإقتران كل على حدة ونشر على سطح أطباق حاوية على YEB, AM, YEM الصلبة المدعمة بالمضادين الحيويين Cef, Rif بالتراكيز الخاصة بكل بكتريا وحسب ماورد في الجدول (4).

- حضنت الأطباق مقلوبة في الحاضنة بظروف (2±28)°م (24) ساعة في الظلام.

- حسب تردد الأقتران بعد معرفة العدد الكلي للخلايا البكتيرية المستلمة بأعتماد معادلة الاقتران (Salle,1973) وكمايأتي:

$$\text{تردد الإقتران} = \frac{\text{عدد الخلايا البكتيرية المقترنة في 1 مل من مزيج الإقتران}}{\text{العدد الكلي للخلايا المستلمة في 1 مل من المزرعة البكتيرية}}$$

3.3.6.3 إحداث الإقتران بين *S.mililoti* (الواهبة) و *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (المستلمة)

- مزج 0.1 مل من معلق كل من بكتريا *S.meliloti* مع كل من معلق بكتريا *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (المشفاة) في أنبوية اختبار حجم 5 مل وأضيف

- الى المزيج 1 مل من وسط (YEM, AM) السائل على التوالي وأعيد تحضير المزيج نفسه باستعمال وسط YEM.
- غلقت الأنبوتان وحضنت في الحاضنة بدون تشغيل المازج بظروف $(2\pm 28)^\circ\text{C}$ (3) ساعات في ظروف الظلام، وحضرت تخافيف عشرية من العالق ولغاية (10^{-7}) .
- أخذ 0.1 مل من كل تخفيف لمزيجي الإقتران كل على حدة ونشر على سطح الاوساط الغذائية YEM, AM, YEB الصلبة المدعمة بالمضادين الحيويين Chlo , Tri وبالتراكيز الوارد ذكرها في الجدول (4).
- حضنت الأطباق مقلوبة في الحاضنة في ظروف $(2\pm 28)^\circ\text{C}$ (24) ساعة.
- وحسب تردد الإقتران بعد معرفة العدد الكلي للخلايا البكتيرية المستلمة بإعتماد المعادلة السابقة الذكر.

4.3.6.3 اختبار الانواع البكتيرية الناتجة من الاقتران

اختبرت البكتريا الناتجة من الاقتران، بين جنسي *Agrobacterium* و *Rhizobium*، باخضاعها الى الاختبارات الكيموحيوية منها اختبار انتاج 3-كيتولاكتوز وزراعتها على وسط ماكونكي، واعادة زراعتها على الاوساط الانتخابية والاوساط المدعمة بالمضادات الحيوية الريفامبسين والجينتاميسين الذي تقاومه بكتريا *Agrobacterium*، واختبرت البكتريا الناتجة من الاقتران باعتماد الاختبار الحيوي، اذ لقحت مجموعة من بادرات الجت بعمر 28 يوماً والنامية في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو بكل من بكتريا المقترنة الناتجة من اقتران *S.meliloti* مع *A.tumefaciens* (AtMcol) مرة، والمقترنة من *A.tumefaciens* (C58C1) وبكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً والمقترنة مع *S.meliloti* مرة أخرى، وبالطريقة نفسها المشار اليها في الفقرة (1.2.8.3)، وحضنت العينات بالظروف المشار اليها مسبقاً علماً أنه استعمل لقاح بكتريا *Agrobacterium* عينة مقارنة موجبة والماء المعقم معاملة المقارنة السالبة للاختبار، ولقحت بادرات بعمر يومين بغمر مجموعها الجذري في 2 مل من لقاح بكتريا *S.meliloti* المقترنة مع *A. tumefaciens*(C58C1)، وبلقاح *A. tumefaciens*(AtMcol) مرة، وبلقاح البرية والمحولة وراثياً والمقترنة مع *S. meliloti* مرة أخرى وذلك بغمر المجموع الجذري (20-25) دقيقة، وبعد ذلك وضعت البادرات بشكل صفاً واحداً على وسط NF الصلب في أطباق بتري قطرها (9) سم وبمعدل (3-4) بادرات/ طبق وحضنت العينات في غرفة الزروعات بالظروف المشار اليها مسبقاً.

7.3 الزراعة النسيجية لنباتات الجت

1.7.3 تكوين مزارع كالس أجزاء بادرات الجت وأدامتها

جهزت قطع السيقان تحت الفلقتية والجذور بأطوال (1 و 2) سم على التوالي، والأوراق بمساحة (0.5) سم² بعد قطع حافاتها من بادرات الجت (العراقي) بعمر 25-30 يوماً ووضعت بمعدل 3 قطع/ دورق بحجم 100 مل على سطح 30 مل لمجموعة من أوساط الأستحداث المعتمدة على أملاح MS و B5 واللذين يعدان وسطين اساسيين مدعمين بإضافات معينة من منظمات النمو وحضنت العينات في غرفة التتمية في الظلام والضوء التعاقبي في (16 ساعة ضوء و 8 ساعة ظلام) وكالاتي:

MS 0 (المقارنة)

MS + 0.1 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.5 mgL⁻¹ kin

MS + 0.25 mgL⁻¹ 2,4-D + 1.0 mgL⁻¹ kin

MS + 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.5 mgL⁻¹ kin

MS + 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D + 1.0 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.1 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.2 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.5 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 1.0 mgL⁻¹ kin

MS + 0.25 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 0.25 mgL⁻¹ 2,4-D + 3.0 mgL⁻¹ kin

MS + 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D + 3.0 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 3.0 mgL⁻¹ kin

MS + 1.5 mgL⁻¹ 2,4-D + 3.0 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ BA

MS + 0.5 mgL⁻¹ NAA + 1.0 mgL⁻¹ BA

MS + 4.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 4.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ BA

MS + 2.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 2.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ BA

واستعملت التداخلات المذكورة انفاً مع وسط B5، وبدأت مراحل ادامة الكالس حين لحظ

علامات الأسوداد أو تشقق الوسط الغذائي حينها يتوجب إعادة زراعته بعد التخلص من أجزائه

الميتة وتحويل الكالس المتبقي بعد تقطيعه إلى قطع صغيرة وزن كل منها (1) غم توضع منفردة

في دورق جديد يحوي على الوسط عينه الذي استحدث الكالس فيه، وتحفظ مزارع الكالس المجددة في الظروف المشار إليها نفسها سابقاً.

2.7.3 تقدير الأوزان الرطبة للكالس

استعمل وسط استحداث الكالس نفسه في ادامته وتقدير الأوزان الرطبة بوزن 1 غم/ قطعة، ونقلت الى دوارق زجاجية وحفظت تحت ظروف الأستحداث المشار إليها نفسها ، وحدد الوزن الرطب للكالس من حساب فرق وزن الدوارق الزجاجية ومحتوياتها قبل الزراعة الثانوية للكالس وبعدها على وسط الأستحداث نفسه بعد 30 يوماً.

3.7.3 تمايز كالس السيقان تحت الفلقية الى نباتات الجت الكاملة

1.3.7.3 تكوين الأفرع الخضرية

أخذت قطع بوزن غرام واحد من كالس السيقان تحت الفلقية ووضعت على سطح 30 مل من أوساط التمايز المتكونة من أملاح وسط MS الصلب مضافاً إليها تداخلات متعددة مشتركة من منظمات النمو المنتخبة في هذه الدراسة كما مبين في ماياتي:

MS 0 (المقارنة)

MS + 0.1 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ BA

MS + 0.5 mgL⁻¹ NAA + 5.0 mgL⁻¹ BA

MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA + 10.0 mgL⁻¹ BA

MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ BA

MS + 3.0 mgL⁻¹ 2,4-D

MS + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 2.0 mgL⁻¹ kin

MS + 11.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 1.0 mgL⁻¹ kin

MS + 2.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ kin + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D

MS + 5.0 mgL⁻¹ NAA + 2.0 mgL⁻¹ kin

وبمعدل 3 قطع/ دورق يحوي على 50 مل من الوسط وحفظت في غرفة الزرع

وبالظروف السابقة الذكر.

2.3.7.3 تكوين المجاميع الجذرية للأفرع الخضرية الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية

أزيلت قطع السيقان المتميزة واستؤصلت الأفرع الخضرية الفلقية بطول 2.5-3 سم

باستعمال بمشرط حاد معقم ثم غرزت قواعد هذه الأفرع منفردة بصورة قائمة في مجموعة من أوساط التجذير المستعملة وكالاتي:

MS0

1/2MS0

1/2 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL⁻¹ NAA

1/2 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL⁻¹ kin

1/2 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL⁻¹ IAA

1/2 MS + (0.5, 1.0) mgL⁻¹ BA

1/2 MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA+ 1.0 mgL⁻¹2,4-D+1.0 mgL⁻¹ IAA

1/4 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL⁻¹ NAA

1/4 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL⁻¹ kin

1/4 MS + (0.5, 1.0,1.5) mgL⁻¹ IAA

1/4 MS + (0.5, 1.0) mgL⁻¹ BA

1/4 MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA+ 1.0 mgL⁻¹2,4-D+1.0 mgL⁻¹ IAA

8.3 تكوين نباتات الجت *M.sativa* مباشرة من انسجته المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً

1.8.3 الكشف عن بقاء العلائم الوراثية (Rest⁺ Rif (Rest⁺، Gen (Rest⁺ في بلازميدات Ti لبكتريا *A.tumefaciens*

اختبرت السلالة *A.tumefaciens* (C58C1) من هذه البكتريا لمعرفة احتفاظها بصفة المقاومة Refampicin و Gentamycin دورياً كل ثلاثة أشهر وقبل استعمالها في عمليات التلقيح بطريقة مزج المضادات الحيوية المذكورة انفا مع الوسط بعد تعقيمه وتبريده الى درجة (45م°) وبالتراكيز المثبتة في الجدول (3) باتباع طريقة نشر 0.1 مل من المعلق البكتيري على سطح وسط YEB، وحفظت الأطباق بدرجة حرارة الحاضنة (28±2) م° (24 ساعة).

2.8.3 تكوين الأورام التاجية على بادرات نباتات الجت بوساطة بكتريا *A. tumefaciens*

1.2.8.3 إنتخاب العمر المناسب والكثافة الضوئية للقاح البكتريا الملائم لحقن البادرات

جهزت بادرات الجت السليمة بعمر (2 و 3 و 4 و 5 و 6) أسابيع وهي الفاقدة لمجموعها الجذري ولقحت بالحقن المباشر بلقاح بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1)، البنية محلياً، بسرنجة دقيقة Needle مغمورة نهايتها في اللقاح البكتيري وبكثافات ضوئية متباينة وهي (0.1 و 0.25 و 0.5 و 0.75 و 1.0 و 1.5) عند الطول الموجي 600 نانوميتر وأستعمل الماء المقطر المعقم في حقن البادرات بوصفها عينة مقارنة، اذ وخزت السيقان تحت الفلجية للبادرات في 3 مواقع مختلفة ثم غرست قواعد البادرات الملقحة فضلاً عن عينات المقارنة وبمعدل (2-3) بادرة بوضع قائم في 30 مل من وسط WP الصلب بنصف قوته التركيبية وحضنت العينات في غرفة النمو في ظروف ظلام تام (24 ساعة

لضمان نمو البكتريا، ثم حضنت العينات في غرفة النمو في ظروف درجة حرارة (2±25)°م (16) ساعة إضاءة 1000 لوكس.

2.2.8.3 تلقيح قطع السيقان تحت الفلجية لبادرات الجت

جهزت بادرات الجت السليمة بعمر 4 أسابيع النامية في وسط MS الصلب واستعمل قطع السويقات تحت الفلجية بطول (2) سم ولقحت بحقنها مباشرة، بواسطة Needle دقيقة معقمة مغمورة نهايتها في المعلق البكتيري لبكتريا *A.tumefaciens* (C58C1) و *A.tumefaciens* (AtMcol) وزرعت بوضع قائم في وسط MSO الصلب وحفظت في الظروف المشار إليها في الفقرة.

3.8.3 بروتوكول عملية التحول الوراثي لبادرات نباتات الجت

نفذت مراحل البروتوكول باستعمال:

- ✓ الأورام التاجية المتكونة على بادرات الجت المحقونة بالاكروبيكتريوم.
- ✓ التكوين المباشر للأفرع الخضرية من الأورام التاجية المتكونة على بادرات الجت المحقونة التي اعتمدت مصدراً للأفرع الخضرية الناشئة من الأورام التاجية لتكوين النباتات الكاملة المفترض تحولها وراثياً.
- ✓ اعتماد مزارع الكالس للأورام التاجية مصدراً للحصول على النباتات الكاملة المفترض تحولها وراثياً.

1.3.8.3 اعتماد مزارع الأورام التاجية مصدراً للحصول على النباتات المحولة وراثياً

1.1.3.8.3 استعمال تقانة الحقن المباشر

أعتمدت تقانة الحقن المباشر لتلقيح بادرات الجت (العراقي) الفاقدة لمجموعها الجذري وكما في الفقرة (1.2.8.3)

2.1.3.8.3 استحداث الأورام التاجية على البادرات الملقحة وسيقانها وتكوين مزارعها الخالية من البكتريا

استؤصلت الأورام التاجية المتكونة في مواقع التلقيح على البادرات الملقحة وقطع سيقانها تحت الفلجية ونقلت الى دوارق زجاجية سعة 250 مل حاوية على 20 مل وسط MSO المدعم بتراكيز متدرجة تصاعدياً 100 و 250 و 500 و 1000 ملغم/لتر Chloramphenicol للأورام الناتجة بفعل بكتريا *A.tumefaciens* (C58C1) و Cefotaxime لوسط الأورام الناتجة بفعل بكتريا *A.tumefaciens* (AtMcol) الذي أضيف الى الوسط بعد تعقيمه

ووصوله الى درجة (45) °م وكانت المدة بين نقلة وأخرى (5-7) أيام لغرض التخلص من البكتريا وأدامتها دورياً على هذا الوسط.

3.1.3.8.3 إختبار خلو الأورام التاجية من بكتريا *A.tumefaciens*

سحقت عينة 0.5 غم من الأورام التاجية في أنبوبة أبندروف حاوية على 1.0 مل من وسط AM للأورام الناتجة من التلقيح بالـ (*AtMcoI*) *A.tumefaciens* و 1.0 مل من وسط YEB للأورام الناتجة من (*C58C1*) *A.tumefaciens* بالقضيب الزجاجي Glass rod المعقم باللهب الكحولي، اعقبها نبذ محتويات الأنبوبة بسرعة 3000 دورة/ دقيقة في جهاز (Centrfuge) وأخذ 0.5 مل من الرائق لتلقيح حجم 10.0 مل من وسطي AM و YEB السائلان في دورق سعة 50.0 مل في الحاضنة الهزازة يومين في ظروف (28) °م.

4.1.3.8.3 استحداث مزارع الكالس من الأورام التاجية المحولة وراثياً

نقلت قطع الأورام التاجية الخالية من البكتريا الى وسط (MS, 1/2 MS) الصلب الحاوي على المضادات الحيوية المذكورة في الفقرة (2.1.3.8.3) الخالية او المدعمة ببعض التداخلات المشتركة من منظمات النمو Kin (0.0 و 1.0 و 2.0) ملغم/لتر والـ 2,4-D (0.0 و 1.0 و 2.0) ملغم/لتر، وبتداخلات من BA (0.0 و 1.0 و 2.0) ملغم/لتر والـ NAA (0.0 و 1.0 و 2.0) ملغم/لتر وحفظت العينات في غرفة الزرع بالظروف المشار اليها مسبقاً.

5.1.3.8.3 تكوين الأفرع الخضرية من كالس الأورام التاجية

نقل 1 غم من الكالس المشتق من الأورام التاجية والنامي على وسط (1/2MS + 1.0 NAA) إلى دوارق سعة (100) مل تحوي كل منها 30 مل من وسط MSO 1/2 مدعماً بإضافات معينة من منظمات النمو وكالاتي:

- 1/2 MS 0 (المقارنة)
- 1/2 MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA
- 1/2 MS + 1.5 mgL⁻¹ NAA
- 1/2 MS + 2.0 mgL⁻¹ NAA
- 1/2 MS + 1.0 mgL⁻¹ NAA + 1.0 mgL⁻¹ BA
- 1/2 MS + 2.0 mgL⁻¹ NAA + 0.5 mgL⁻¹ BA
- 1/2 MS + 2.0 mgL⁻¹ NAA + 1.0 mgL⁻¹ BA

6.1.3.8.3 اختبار تحمل الأفرع الخضرية المتمايزة من كالس الأورام التاجية للريفامبسين والجينتاميسين

فصلت الأفرع الخضرية بطول 1.5 سم الناتجة من كالس الأورام التاجية المحولة وراثياً باستعمال مشروط حاد معقم، وغرست منفردة قائمةً في دوارق سعة 100 مل حاوية على 30 مل من وسط 1/2MS الصلب المدعم بإضافة 2.0 ملغم/لتر NAA المزودة بإضافة 100 ملغم/لتر Rifampicin و 40 ملغم/لتر Gentamycin و 250 ملغم/لتر Rifampicin و 40 ملغم/لتر Gentamycin المشتقة من كالس الأورام التاجية المتكونة بفعل *A.tumefaciens* (C58C1) و *A.tumefaciens* (AtMcol) على التوالي. وحفظت القناني في غرفة الزروعات المشار إليها في الفقرة (1.2.8.3) ولوحظت النتائج في 30 يوماً.

7.1.3.8.3 اختبار تحمل كالس الأورام التاجية المحولة وراثياً للريفامبسين والجينتاميسين

وضعت قطع الكالس المشتق من الأورام التاجية المحولة وراثياً بشكل منفصل على سطح 30 مل من وسط 1/2MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر NAA، واستعملت هذه الأوساط مضافاً إليها 100 ملغم/لتر Rifampicin و 40 ملغم/لتر Gen، و 250 ملغم/لتر Rifampicin و 40 ملغم/لتر Gen للكالس المشتق من الأورام التاجية الناشئة بفعل *A.tumefaciens* (C58C1) و *A.tumefaciens* (AtMcol) على التوالي. وحفظت العينات في غرفة الزروعات في الظروف المشار إليها سابقاً في الفقرة (1.2.8.3)

8.1.3.8.3 نقل النباتات الى وسط الاستطالة

نقلت الأفرع الخضرية المقاومة للRif الى دوارق زجاجية حجم 150 مل حاوية على 25 مل من وسط الاستطالة الأتي لغرض استطالة الأفرع الخضرية المنتخبة:
MS + B5 Vit + 1 mgL⁻¹ Zit + 0.5 mgL⁻¹ GA3 + 0.1 mgL⁻¹ IAA + 50 mgL⁻¹ glutamine + 3% Sucrose (Zhang et al., 1999)

9.1.3.8.3 التكوين المباشر للأفرع الخضرية المحولة وراثياً من الأورام التاجية المتكونة على البادرات المحقونة بالأكروبيكتريوم

استعملت الأفرع الخضرية الناشئة من الأورام التاجية للبادرات الملقحة ببكتريا *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً لتكوين النباتات الكاملة، إذ أستوصلت هذه الأفرع عن البادرات الملقحة واختبرت لتحمل الريفامبسين والجينتاميسين على الأوساط الانتخائية كما ورد في الفقرة (6.1.3.8.3)، و ثم نقلت الأفرع المنتخبة الى وسط الاستطالة (8.1.3.8.3)، ونقلت الى اوساط التجذير كما ورد في الفقرة (2.4.7.3).

10.1.3.8.3 تقانة كروماتوكرافيا الورق النازل في الكشف عن الاوبينات (Octopine, Napoline) في انسجة وكالس الاورام التاجية

أخذ 100 ملغم من الاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً وأخرى من كالسها ووزن مماثل من سيقان البادرات الاعتيادية وكالسها (المقارنة) في انبوبة ابندروف كل على حدة وأضيف لكل منها 100 مايكروليتر من (0.1) عياري حامض الهيدروكلوريك (0.1 N HCl) سحقت العينات منفردة باستعمال قضيب زجاجي وتطرده مركزياً عند (600) دورة /دقيقة و 20 دقيقة، ثم سحب الراشح في كل عينة من العينات قيد الدراسة لغرض مقارنته مع الاوبينات القياسية (Szegedi et al., 1988) (Octopine, Napoline) مل و بعدها اجري تحليل لكروماتوكرافيا الورق النازل باستعمال اوراق ترشيح من نوع Whatman No.3 وبمحلول التشرب المتكون من-1 (Water: glacial acetic acid, butanol، بنسبة(1:1:4) (حجم:حجم:حجم) وبزمن تشرب (48) ساعة ثم بعد ذلك إزالة اوراق الكروماتوكرافيا لتجف في الهواء ساعة ثم صبغت بمحلول كاشف نترات الفضة Silver Nitrate (الملحق 17) وبعد تجفيفها (15-30) دقيقة غمرت في محلول Methanolic NaOH لإظهار البقع وتجفيفها بالهواء ثانية (30) دقيقة وأخيراً غطست في المحلول المثبت $5\% \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ متبوعاً بغسلها بالماء الجاري (30) دقيقة وتركت لتجف في الهواء (Tepfer & Tempe, 1981)، وقورنت بقع العينات المحولة ببكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) ببقع النوبالين القياسي Napoline والعينات المحولة ببكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) ببقع (Nopaline, Octopine) القياسيين لتحديد نوع الأوبين الذي تصنعه البكتريا البرية داخل النسيج النباتي المصاب.

9.3 الدراسة عند المستوى الجزيئي

1.9.3 الكشف عن محتوى DNA البلازميدي في بكتريا *S. meliloti* و *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً

1.1.9.3 عزل DNA البلازميدي وتنقيته

عزلت البلازميدات بالعدة (Kit- Accuprep® Plasmid Mini Extraction Kit (Kit-3030, K-3030-1) التي جهزتها شركة BIONEER KOREA و تضمنت مجموعة من المحاليل فضلاً عن DNA binding Column tube والتي حفظت بدرجة حرارة (4م°):

الجدول (6) مكونات عدة العمل الجاهزة لعزل DNA البلازميدي وتنقيته

المحاليل	الحجم/الوزن
Buffer 1	15 ml
Buffer 2	15 ml
Buffer 3	20 ml
Buffer D	18 ml
Buffer 4	2×4 ml
Buffer 5	6 ml
RNase APowder	1.5 mg

وعزلت البلازميدات حسب بروتوكول الشركة وكما موضح فيما يأتي:

1. مرحلة تحضير المعلق البكتيري

حضر المعلق البكتيري للبكتريا القياسية (*A. tumefaciens* (C58C1) والبكتريا البرية *A. tum* (AtMcol) وعزلات بكتريا *S. meliloti* بمزج حملة لوب من كل بكتريا مع 10 مل من الوسط الملائم لها ، وحضنت بالحاضنة الهزازة في ظروف الظلام التام بدرجة حرارة (28±2)°م (24) ساعة بسرعة دوران 150 دورة/دقيقة.

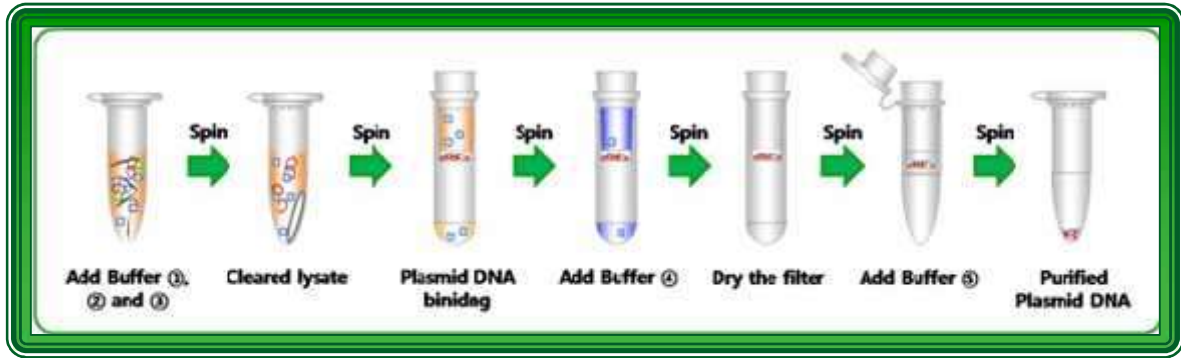
2. مرحلة تكوين الخلايا المتحللة الرائقة

- رسبت الخلايا بعد نقلها تدريجياً الى أبندروف حجم (1.5) سم بجهاز الطرد المركزي المبرد الخاص من نوع (Eppendorf microcentrifuge) وبسرعة 8000 rpm ولمدة دقيقتين، وثم وازيل الوسط بالكامل منها.
- اضيف 250 مايكروليتر من محلول Buffer 1 إلى الخلايا المترسبة ومزجت البكتريا بالمزج الكهربائي Vortex للحصول على تحلل كامل للخلايا.
- اضيف 350 مايكروليتر من محلول Buffer 2 ومزج بقلب الأنبوب 3-4 مرات بهدوء.
- اضيف 350 مايكروليتر من محلول Buffer 3 ومزج بقلب الأنبوب 4 مرات.
- إجراء الطرد المركزي بسرعة 13000 rpm لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 4°م.

3. مرحلة عزل DNA البلازميدي وتنقيته

- نقلت الخلايا المتحللة إلى أنابيب خاصة من الشركة المجهزة للعدة وهي أنابيب ارتباط الحمض النووي DNA binding Column مثبت على أنبوب آخر وهو Collection Tube عن طريق السكب مع تجنب إثارة الراسب.

- إجراء عملية طرد مركزي للأنايب بسرعة 13000 rpm دقيقة واحدة ثم نزع الأنبوب Binding Column Tube وطرح الراشح من الأنبوب Collection Tube وبعدها اعيد جمع Filter Column مع انبوب الجمع Collection Tube.
- أضيف 700 مايكروليتر من المحلول Buffer 4 ثم أجري الطرد المركزي بالسرعة 13000 rpm دقيقة واحدة في درجة حرارة الغرفة ثم نزع الأنبوب Binding Column Tube وطرح الراشح من أنبوب الجمع Collection Tube .
- أجري طرد مركزي إضافي وبسرعة 13000 rpm دقيقة واحدة لإزالة بقايا الإيثانول بالكامل.
- أذيب الـ DNA البلازميدي بإضافة 100 مايكروليتر من Buffer 5 (الشكل 7)
- حفظت الأنايب Eppendorf في درجة حرارة -20°م لحين الاستعمال.



الشكل (7): خطوات عزل الـ DNA البلازميدي وتنقيته

2.1.9.3 الترحيل الكهربائي Electrophoresis لنماذج الـ DNA البلازميدي

تم وصف وكشف محتوى الـ DNA البلازميدي لبكتريا *S. meliloti* البرية والمحولة وراثيا والنااتجة من الاقتران بتقانة الترحيل على هلام الاكاروز من اجل المقارنة بين أنماط الـ DNA البلازميدي لهذه العزلات ولإعطاء الدعم لعملية الإقتران. وقد اعتمدت طريقة (Al-kanaany et al., 2012) في تحضير هلام الأكاروز وترحيله كهربائياً اذ أذيب (0.8)غم من الأكاروز في (100) مل من محلول TBE 1X ليصبح التركيز (0.8%)، ثم سخن محلول الأكاروز الى درجة (100)°م مع التحريك المستمر بجهاز المحرك المغناطيسي وترك ليبرد في الحمام المائي في درجة (50)°م، وبعد تبريده سكب ببطء على شكل طبقة في القالب المخصص له بعد وضع المشط لتكوين الحفر على احدى طرفي القالب .وترك هلام الاكاروز بوضع افقي نصف ساعة ليتصلب ثم رفع المشط وظهرت حفر ذات ابعاد متساوية اذ استعملت لتحميل عينات الـ DNA البلازميدي واضيفت (5) مايكروليتر من صبغة التحميل لنماذج الـ DNA البلازميدي المحضرة المراد توصيفها والكشف عنها. حملت العينات داخل الحفر الخاصة بها ثم ملئ حوض الترحيل بالمحلول TBE 1X ثم ربط جهاز الترحيل الكهربائي

بمجهز القوة الكهربائية الخاص بالجهاز تحت فرق جهد (20) فولت (30) دقيقة ثم نقلت الى (80) فولت (3) ساعات، وبعدها صبغ الهلام بصبغة بروميد الأثيديوم بتركيز (0.5) مايكروغرام/مل (15-30) دقيقة ثم نقلت قطعة الهلام الى جهاز التألق الإشعاعي (U.V. Transilluminator) الموجود داخل غرفة مظلمة ثم صورت قطعة الهلام بكاميرا رقمية.

3.1.9.3 تقدير تراكيز الـ DNA البلازميدي المعزول ونقاوته

قدر تركيز الـ DNA بقياس الامتصاصية لطيف الاشعة فوق البنفسجية بجهاز الامتصاصية Spectrophotometer وعند الطول الموجي (260) نانوميتر، وحسب تركيز الـ DNA وفق المعادلة: (Sambrook *et al.*, 1989)

Optical density of (1) at 260 nm = 50 (µg/ml)

$$\frac{\text{القراءة} \times \text{معامل التخفيف} (100) \times 50}{\text{حجم المزرعة الجرثومية المحضرة}} = \text{التركيز (مايكروغرام /مل)}$$

اما النقاوة فقدرت من حاصل قسمة قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (260) نانوميتر على حاصل قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (280) نانوميتر، اذ ان افضل نقاوة تكون ما بين (1.8-2.0).

2.9.3 استخلاص الحمض النووي المنقوص الأوكسجين الكروموسومي من النبات

إستخلص الحمض النووي DNA من الأورام التاجية الطرية وكالسها وسيقان الأفرع الخضرية المتميزة من الأورام لنباتات الجت باستعمال عدة عمل جاهزة Genomic DNA Mini Kit Plant من شركة Geneaid والتي تضمنت مجموعة من المحاليل فضلاً Filter 2ml Collection Tube ،GD Column ،Column

الجدول (7) مكونات عدة العمل الجاهزة لاستخلاص الـ DNA النبات

المكونات	الحجم (مل)
GPI Buffer	50
GPXI Buffer	50
GP2 Buffer	15
GP3 Buffer	30
Add Isopropanol	60
WI Buffer	45
Wash Buffer	25
Add Ethanol	100
Elution Buffer	30
RNase A (10 mg/ml)	0.55

1.2.9.3 مرحلة عزل الـ DNA

- سحق 0.1 غم من النسيج النباتي الطري في هاون خزفي بعد إضافة 25 مل من النتروجين السائل الذي أدى إلى تصلب النسيج النباتي في درجة حرارة الغرفة 15 ثانية لحين الحصول على عجينة لينة. تم اتباع البروتوكول الخاص بالشركة لعزل DNA وكالاتي:
1. نقل المسحوق المذكور انفاً إلى أنابيب أبندروف حجم (1.5) مل وأضيف إليها 400 مايكروليتر من محلول GPI Buffer أو GPXI و 5 مايكروليتر من RNase A ومزجت بالمزج الكهربائي Vortex 5 ثوانٍ.
 2. حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة (65) °م (10) دقائق ثم أضيف (100) مايكروليتر من محلول GP₂ Buffer مع المزج بواسطة المازج الكهربائي Vortex ثم حضنت الأنابيب بالتلج 3 دقائق.
 3. ونقل محتوى الأنبوب إلى عمود الترشيح Filter Column المركب على أنبوب الجمع ونبذ مركزياً بسرعة دوران 1000 rpm دقيقة واحدة.
 4. نقلت الطبقة العليا إلى أنبوبة Eppendorf جديدة ومعقمة بحجم (1.5) مل.
 5. أضيف مقدار 1.5 مرة من حجم العينة من محلول GP3 Buffer (لتحليل الخلايا)، مع المزج بجهاز Vortex 5 ثوانٍ.

2.2.9.3 مرحلة غسل وتنقية الـ DNA

1. نقل 700 مايكروليتر من الخليط السابق إلى عمود GD Column موضوع في أنبوب الجمع Collection tube ونبذ مركزياً بسرعة 14000 rpm دقيقتين.
2. أضيف 400 مايكروليتر من محلول W1 Buffer إلى GD Column المركب على أنبوب الجمع Collection Tube، ثم نبذ مركزياً بسرعة (14000-16000) rpm (30) ثانية.
3. أزيل الراشح بواسطة الماصة الدقيقة وأضيف إليه 600 مايكروليتر من محلول Wash Buffer، ثم نبذ مركزياً بسرعة (14000-16000) rpm ولمدة (30) ثانية.
4. أزيل الراشح وتم إعادة تركيب GD Column على أنبوب Collection Tube مرة أخرى، وأجري له طرد مركزي بسرعة (14000-16000 rpm) .
5. اذيب الـ DNA بإضافة 100 مايكروليتر من محلول Elution Buffer .
6. حفظت الأنابيب Eppendorf في درجة حرارة -20 °م لحين الاستعمال.

3.9.3 فحوصات السيطرة النوعية

اعتمدت ثلاثة فحوصات للسيطرة النوعية للتحري عن مدى صلاحية الحمض النووي المستخلص من DNA وللعينات قيد الدراسة باستعمال المسالك الآتية:

1.3.9.3 تقدير تراكيز الحمض النووي الجينومي gDNA المستخلص ونقاوته

حدد تركيز gDNA للعينات قيد الدراسة بجهاز المطياف الضوئي ذو القطرة الدقيقة Biodrop عند الطول الموجي 260 نانوميتر.

وحددت نقاوة الحمض النووي gDNA من قراءة الامتصاصية في جهاز Biodrop عند الطولين الموجيين 260، 280 نانوميتر، وأجريت الخطوتين كالاتي.

1. بعد تشغيل جهاز المطياف الضوئي ذي القطرة الدقيقة Biodrop ثم تحديد المسار المتخصص لقياس الحمض النووي ضمن الجهاز، وتنظيف العدسة السفلى (Pedestal- lines) بورق تنظيف خاص يطلق عليه (Chen-Wipe)، اضيف 5 مايكروليتر من Nuclease free water (DDH₂O) بالماسة الميكانيكية الدقيقة على سطح العدسة المذكورة لغرض معايرة الجهاز.

2. اضيف 5 مايكروليتر من عينات gDNA قيد الدراسة على العدسة السفلى قرئت الامتصاصية وحدد التركيز ثم النقاوة، وتعد النقاوة مقبولة حين تقارب (1.8) في حين تكون دليلاً على وجود تلوث لحمض نووي آخر اذا تجاوزت هذه النسبة (2.0) اما اذا انخفضت عن (1.6) فهو دليل على وجود بروتين مذاب او مركبات أخرى مثل الفينول التي تعمل ملوثاً يستطيع الجهاز قياسها عند الطول الموجي (280 nm).

2.3.9.3 الترحيل على هلام الاكاروز

اما المسلك الثاني فتضمن التداخل الحاصل لجزيئات الحمض النووي الجينومي gDNA للعينات قيد الدراسة مع مسامات الاكاروز (Agarose gel) بعملية الترحيل الكهربائي وكما يأتي:

اولاً: طريقة تحضير هلام الاكاروز Agarose gel

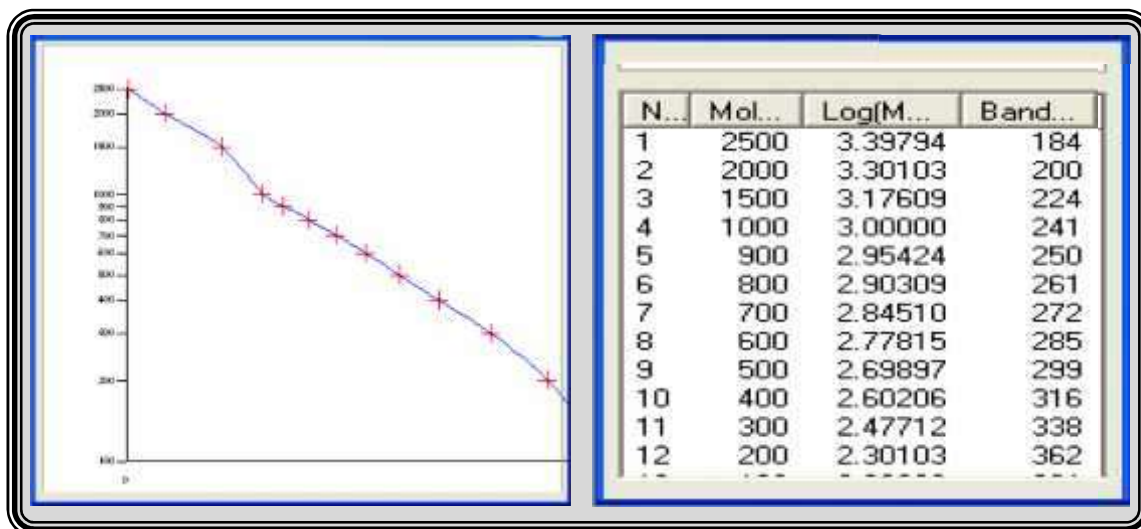
1. لترحيل DNA الجينومي والكشف عنه وتقدير حجمه الجزيئي حضر هلام الاكاروز بتركيز (1%) اما لتفاعلات PCR فقد حضر بتركيز (1.2-1.5%)، وللحصول على تركيز (1%) اذيب 1 غم من مسحوق الاكاروز في (100) سم³ TBE بقوة 1X واستكملت خطوات التحضير للهلام كما ورد في الفقرة (2.1.9.2).

ثانيا: عملية الترحيل الكهربائي للDNA المعزول على هلام الاكاروز

1. حضرت عينات الترحيل بمزج (15) مايكروليتر من عينة الDNA مع (5-7) مايكروليتر من محلول التحميل loading buffer (Bromophenol blue) بالماصة الدقيقة.
2. حملت العينات في حفر الهلام وحضر الدليل الحجمي الDNA لاما (Total size 2500 bp, 100 bp DNA BIONEER KOREA) في حفرة خاصة على احد جانبي الهلام .
3. شغل جهاز مجهز القدرة بإمرار التيار الكهربائي بفرق جهد 50 فولت وبعد ضبط الاقطاب (1.5-2) ساعة .
4. وبعد انتهاء الترحيل صبغ الهلام كما ورد وفحص في الفقرة (2.1.9.3) بكاميرا رقمية عالية الحساسية.

4.9.3 تقدير الاوزان الجزيئية

قدرت الاوزان الجزيئية للDNA اعتمادا على المسافات التي قطعتها هذه الجزيئات في الهلام والتي تتناسب عكسيا مع اوزانها الجزيئية باستعمال قطع الDNA المعروفة الوزن الجزيئي وهي الدلائل الحجمية (Markers) اذا استعمل الدليل الحجمي (Total size 2500 bp, 100 bp DNA BIONEER KOREA (الشكل 8)



الشكل (8) الاوزان الجزيئية للدليل الحجمي المستعملة في الدراسة

5.9.3 Specific PCR التشخيص الجزيئي بتقانة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا

1.5.9.3 التشخيص الجزيئي لبكتريا *A. tumefaciens* المكونة للاورام التاجية والبرية من الاورام التاجية لنباتات الآس *Myrtus Communis* باستعمال تقنية الـ sPCR

استعملت بادئات Primers متخصصة للتشخيص للجزيئي للبكتريا البرية من الاورام التاجية لنباتات الآس *Myrtus communis* والمتمثلة ببادئتين متخصصتين للجين الـ *rol B* التي صممها قسم التقانات الاحيائية /كلية العلوم /جامعة بغداد اعتمادا على تسلسل القواعد النروجينية للجين *rol B* ضمن بلازميد Ti (Goodner *et al.*,2001) في قاعدة البيانات لبنك الجينات ضمن الموقع الالكتروني للمركز العالمي لمعلومات التقنيات الاحيائية (NCBI accession number JN697592, <http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer>).

احدهما Forward وهو CPF ذو التسابع 5'TCC CTG GAA GAA CTT والآخر العكسي CPR ذو التسابع 5'TTT GGC AAA CCA AAT TCC. واجريت التجارب كافة الخاصة بالتشخيص والكشف عن التحول الوراثي عند المستوى الجزيئي Molecular Screening في مختبر البايولوجي الجزيئي في المعهد التقني /قسم التحليلات المرضية بتقانة Gradient-PCR.

2.5.9.3 التحري عن الجين *rol B* في البكتريا الناتجة من اقتران *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً مع *S. meliloti* التي شملت:

Transconjugant Sinorhizobium (AtMcol)

Transconjugant Sinorhizobium (C58C1)

للكشف عن الجين *rol B* المحمول على بلازميد الامراضية Ti-plasmid لبكتريا *A. tumefaciens* البرية والمتوقع انتقاله من الاكروبيكتريوم الى *S. meliloti* بتقانة الانتقال الاقفي للجينات المتمثلة بعملية الاقتران.

3.5.9.3 التحري الجزيئي عن احتفاظ جينوم الانسجة المحولة وراثياً بجينات T-DNA لبكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً من خلال الكشف عن الجين *rol B* بتضخيم الحمض النووي gDNA المعزول من:

- أنسجة الاورام التاجية لبادرات الجت *M.sativa* المحقونة ببكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) البرية.

- أنسجة الاورام التاجية لبادرات الجت *M.sativa* المحقونة ببكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثياً.

- أنسجة الافرع الخضرية الناشئة من الاورام التاجية لنباتات الجت *M.sativa* المحقونة ببكتريا (*A. tumefaciens* (AtMcol) البرية).
- أنسجة الافرع الخضرية الناشئة من الاورام التاجية لنباتات الجت *M.sativa* المحقونة ببكتريا (*A. tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثياً).
- أنسجة كالس الاورام التاجية المشتقة من البادرات المحقونة ببكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) البرية.
- أنسجة كالس الاورام التاجية المشتقة من البادرات المحقونة ببكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثياً.
- أنسجة الافرع الخضرية لكالس الاورام التاجية المشتقة من البادرات المحقونة ببكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) البرية.
- أنسجة الافرع الخضرية لكالس الاورام التاجية المشتقة من البادرات المحقونة ببكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثياً.

4.5.9.3 المواد والمحاليل المستعملة في اجراء تفاعل sPCR

يظهر (الجدول 8) مكونات انابيب الخاصة الحاوية على PCR PreMix والموجودة ضمن Kit (Bioneer) والمبينة في الجدول (8)

الجدول (8) مكونات PCR premix المجهز من شركة Bioneer

حجم التفاعل 20 µl	المكونات
1U	أنزيم البلمرة (Taq DNA Polymerase)
250 µm	dNTPs
10 mm	Tris-HCl (pH 2.0)
30 mm	KCl
1.5 mm	Mgcl ₂

ولتحضير حجم محلول التضخيم المكافئ كما أوصت له الشركة. حضرت المتطلبات الاساسية لانجاز هذا التفاعل في تجارب البكتريا والانسجة النباتية كما هو مبين في الجداول (9,10) على التوالي.

الجدول (9) المتطلبات الأساسية لانجاز التفاعل التسلسلي البوليميري sPCR في تجارب البكتريا.

الحجم لعينة واحدة (مايكروليتر)	التركيز النهائي	المكونات
----	----	Premix
1.5	10 بيكامول مايكروليتر ¹	Forward specific preimer
1.5	10 بيكامول مايكروليتر ¹	Reverse specific preimer
5	50 نانوغرام مايكروليتر ¹	Templates DNA
12	----	Double-distilled sterile water
20	----	الحجم النهائي

تحضير خليط التفاعل في ظروف معقمة تجنباً لحدوث تلوث وتنفيذ الخطوات جميعها داخل وعاء يحوي ثلج ولتحضير حجم محلول التضخيم المكافئ لانجاز التفاعل التسلسلي البوليميري sPCR (في تجارب الانسجة النباتية) حضرت كالاتي.

الجدول (10) المتطلبات الأساسية لانجاز التفاعل التسلسلي البوليميري sPCR (في الانسجة النباتية المحولة وراثياً)

الحجم لعينة واحدة (مايكروليتر)	التركيز النهائي	المكونات
----	----	Premix
2.0	10 بيكامول مايكروليتر ¹	Forward specific preimer
2.0	10 بيكامول مايكروليتر ¹	Reverse specific preimer
5.0	50 نانوغرام مايكروليتر ¹	Templates DNA
11.0	----	Double-distilled sterile water
20	----	الحجم النهائي

تحضير خليط التفاعل في ظروف معقمة تجنباً لحدوث تلوث وتنفيذ الخطوات جميعها داخل وعاء يحوي ثلج

5.5.9.3 خطوات التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا وتضمنت الآتي:

1.5.5.9.3 التفاعل التضاعفي لسلسلة الDNA للعينات البكتيرية

حضر خليط التفاعل الرئيس باستعمال اثني عشر انبوباً من انابيب Premix بمزج مكونات التفاعل الجدول (9) واطيف اليها 1.5 مايكروليتر من البادئ الامامي المتخصص بتركيز 10 بيكامول مايكروليتر⁻¹ و الحجم نفسه من البادئ العكسي المتخصص و5 مايكروليتر. من الDNA البلازميدي بتركيز 50 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ (للبكتريا البرية وعينة المقارنة *A. tumefaciens* C58C1) والنتيجة من الاقتران (Transconjugant) Sinorhizobium ويكمل الحجم بإضافة 12 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم الخالي من الايونات Double-distilled sterile water ووزعت الانابيب الاثنا عشر في المبلر الحراري ، لاحداث التفاعل بعملية التضخيم باستعمال برنامج التفاعل المتسلسل لانزيم البلمرة المتدرج الحرارة Gradients Thermocycler (الجدول 11)، إذ يرمج الجهاز باستعمال درجات حرارية متدرجة لانتخاب درجة الحرارة الملائمة لارتباط البادئ بقالب الحمض النووي.

الجدول (11) برنامج تفاعل البلمرة المتدرج الحراري المستعمل في هذه الدراسة (Gradient PCR)

هدفها	ظروفها		عدد الدورات
	درجة الحرارة (سيليزية)	المدة (ثانية)	
المسخ الاولي بشريط الحمض DNA	95	180	دورة واحدة
مسخ الشريط المزدوج	94	30	35 دورة بواقع ثلاث دورات لكل منها
ارتباط البادئ بقالب الحمض DNA	51*($\Delta\pm 51$)	30	
استطالة البادئ	72	30	
استكمال استطالة البادئ	72	300	دورة واحدة
مرحلة التبريد	4	60	-

*($\Delta\pm 51$) (1=50.4(+), 2=50.7(+), 3=51.1(+), 4=51.5(-), 5=51.9(-), 6=52.3(+), 7=52.6(-), 8=53.3(-), 9=53.6(-), 10=54.1(-), 11=54.6(-))

وبعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الانابيب وحمل 5 مايكروليتر من نواتج التفاعل في الحفر الكائنة في طبقة الهلام بتركيز 1.5%، وحملت الحفرة الطرفية لاجد جهتي الهلام بوضع 5 مايكروليتر من الدليل الحجمي للحمض النووي DNA, DNA, DNA (λ DNA) DNA, DNA, DNA (total size 2500 bp (Bioneer,)) ونفذ ترحيل العينات المحملة في الهلامه بجهاز الترحيل الكهربائي بامرار تيار كهربائي عند فرق جهد 70 فولت 45 دقيقة، ثم رفعت الهلامه وصبغها وفحصها بالطريقة السابقة الذكر في الفقرة (2.1.9.2) للكشف عن حزم الحمض النووي المنفصلة (المرحلة) وتصويرها بالكاميرا الرقمية عالية الحساسية.

2.5.5.9.3 خطوات التفاعل في الانسجة النباتية

حضر خليط التفاعل الرئيسي باستعمال اثني عشر انبوباً من انابيب Premix بمزج مكونات التفاعل الجدول (10) ويضاف اليها 2.0 مايكروليتر من البادئ الامامي المتخصص بتركيز 10 بيكامول مايكروليتر⁻¹ و الحجم نفسه من البادئ العكسي المتخصص و5 مايكروليتر من الحمض النووي الـDNA القالب (المعزول من الانسجة النباتية) بتركيز 50 نانوغرام مايكروليتر⁻¹ ويكمل الحجم النهائي للمزيج باضافة 11 مايكروليتر من الماء المقطر الخالي من الايونات، ثم وزعت الاثنا عشر انبوباً في جهاز المبلر الحراري (TECHNE TC-512) (UK) لاحداث التفاعل بعملية التضخيم باستعمال برنامج التفاعل المتسلسل لانزيم البلمرة المتدرج الحرارة Gradients Thermocycler (الجدول11)، وبرمج الجهاز واجري التفاعل ورحلت العينات وصبغ الهلام للكشف عن الحزم المرحلة كما ورد في الفقرة (1.5.5.9.2) الخاصة في التضخيم والكشف عن جين الـ *rol B* في العينات النباتية.

الفصل الرابع

النتائج – أولاً

عزل بكتريا *A. tumefaciens* و *S. meliloti* وتشخيصهما

أولاً: عزل بكتريا *A. tumefaciens* & *S. meliloti* وتشخيصها

1.4 عزل بكتريا *A. tumefaciens* من الأورام التاجية لنباتات الآس *Myrtus communis* وتشخيصها

بعد الحصول على المستعمرات المنفردة من البكتريا المعزولة من الاورام التاجية لنباتات الآس والتي أعطي لها الرمز (*A. tumefaciens* (AtMcol)، أجريت لها الإختبارات الآتية:

1.1.4 الصفات المورفولوجية والزرعية

ظهرت المستعمرات البكتيرية النامية على وسط الـ YEM الصلب بلون أبيض مائل الى الكريمي وبشكل دائري محدب وبقطر (1-1.5) ملم وقوام مخاطي، وعند تحضير مسحات من هذه المستعمرات وصبغها بصبغة كرام وفحصها بالمجهر الضوئي المركب بالعدسة الزيتية (100X) ظهرت انها بكتريا عصوية سالبة لصبغة كرام، وكانت هذه النتائج مطابقة لمزارع ومسحات بكتريا *A. tumefaciens* القياسية ومسحاتها.

2.1.4 اختبار النمو على الأوساط القياسية

تميزت المستعمرات النامية على وسط MaCconky Agar باكتسابها للون الوسط البنفسجي بعد (24 ساعة) من التحضين، واعطت نتيجة ايجابية حين نموها على مختلف الاوساط كوسط Glucose Peptone Agar و Luria-Bertani Medium و Potato dextrose agar، وظهرت انها سالبة في تفلورها حين نموها على وسط King medium وحين فحصها بجهاز UV light Transilluminator وكانت هذه النتائج مطابقة لعينة المقارنة *A. tumefaciens* (C58C1) وكما هو واضح في الجدول(12).

الجدول(12) نمو بكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً (معاملة المقارنة) على الأوساط الإنتخابية

<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)	الأوساط الغذائية
+	+	MaCconkey agar
+	+	Luria-bertani medium
-	-	Fluorescent & Pigmentation in king B medium
+	+	Glucose Peptone agar
+	+	Potato dextrose agar

3.1.4 الإختبارات الكيموحيوية

بينت نتائج هذه الاختبارات ان البكتريا المعزولة تمتلك القدرة على انتاج انزيم الكاتليز الذي يدل على اختزال بيروكسيد الهيدروجين من ملاحظة تكوين فقاعات من الغاز على شريحة الفحص.

وأعطت نتيجة سالبة فيما يخص اختبار استهلاكها للتايروسين، والسترات بدلالة ان لون الوسط لم يتغير الى اللون الأزرق، في حين كانت موجبة في استهلاكها لسكر اللاكتوز والمانتول من خلال تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر وأظهرت البكتريا المعزولة قابلية جيدة على النمو في درجات حرارة متباينة تتراوح ما بين (28-35)°م وبوجود عدد من عوامل النمو كالبايوتين او الثايمين او غيابها ، وفي درجات متباينة من الأس الهيدروجيني (4-9)، هذا فضل عن نموها واكتسابها للصبغة في وسط YEM الحاوي على سترات الأمونيوم الحديدية وكانت هذه النتائج مطابقة للنتائج التي ابدتها العزلة القياسية(الجدول 13)، باستثناء عدم انتاجها لغاز كبريتيد الهيدروجين.

الجدول (13) الإختبارات الكيموحيوية للبكتريا المعزولة والمحولة وراثياً (معاملة المقارنة)

Isolated Strain		الإختبارات الكيموحيوية	
<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)		
+	+	Catalase	
+	+	Lactose	Utilization of carbohydrates
+	+	Mannitol	
-	-	L-tyrosine utilization	
-	-	Citrate utilization	
+	+	28°C	Growth at
+	+	35°C	
-	-	40°C	
(4-9)	(4-9)	pH range	
+	+	Biotine	Growth absence
+	+	Thiamine	
+	-	H ₂ S Product	
+	+	Growth & Pigmentation in ferric Ammonium Citrate	

4.1.4 اختبار القدرة المرضية للبكتريا المعزولة

اجريت الأختبارات الإراضية لبيان قدرة البكتريا المعزولة على تكوين الأورام وكالاتي:

1.4.1.4 اختبار القدرة المرضية للبكتريا على اصابة بادرات نباتي زهرة الشمس

Helianthus annuus والطماطة *Lycopersicon escaletum*

أظهرت نتائج العدوى الإصطناعية لاختبار القدرة المرضية (الجدول 14) للبكتريا المعزولة على اصابة العوائل النباتية قيد الأختبار والتي تمثلت بنباتي زهرة الشمس *Helianthus annuus* الذي يعود للعائلة المركبة ونبات الطماطة *Lycopersicon escaletum* و يعود للعائلة الباذنجانية، اذ نجحت في تكوين الأورام بشكل واضح على نباتات زهرة الشمس بمدة (29) يوماً من الاصابة الشكل (9)، فضلاً عن تكوينها للجذور العرضية على السيقان تحت الفلجية واعادة تكوين المجموع الجذري والتراكيب الشبيهة بالأورام عليه التي ظهرت واضح حين فحص الجذور تحت المجهر الضوئي، وأبدت قدرة واضحة في تكوين الأورام التي بدت بشكل نتوءات على سيقان بادرات الطماطة واكتمل نمو الورم في بعد (24) يوماً من الاصابة (الشكل 9)، أما فيما يخص بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) (معاملة المقارنة)، فقد أبدت أيضاً نتيجة ايجابية واضحة في تكوين الأورام على منطقة التاج في بادرات زهرة الشمس بعد (25) يوماً من الاصابة ، وتكوين المجموع الجذري والتراكيب الشبيهة بالاورام عليها والجذور العرضية على السيقان، فضلاً عن انها ايضاً نجحت في تكوين الأورام على سيقان بادرات الطماطة بعد (21) يوماً من الاصابة ،في حين لم تظهر اي استجابة على البادرات المحقونة بالماء المقطر المعقم .

الجدول (14) اختبارات القدرة الإراضية للبكتريا المعزولة من الأورام التاجية لنباتات الآس

على تكوين الأورام في اربعة نباتات مختلفة

النباتات المختبرة								السلالة البكتيرية
الاقراص				البادرات				
<i>Carrot</i>		<i>Potato</i>		<i>Lycopersicon escaletum</i>		<i>Helianthus annuus</i>		
(يوم)	الإراضية	(يوم)	الإراضية	(يوم)	الإراضية	(يوم)	الإراضية	
34	+	25	+	(24)	+	(29)	+	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)
38	+	22	+	(21)	+	(25)	+	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1) ⁺
0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	(Distilled water) ⁻

الشكل (9) اختبار القدرة الامراضية للبكتريا *A. tumefaciens* المعزولة ومعاملة المقارنة على تكوين الاورام التاجية على بادرات الطماطة *Lycopersicon esculentum* وزهرة الشمس *Helianthus annuus*

A. تكوين الورم التاجي (الجزء المؤشر) على بادرة الطماطة الملقحة بالبكتريا *A. tumefaciens* البرية.

B. تكوين الورم التاجي (الجزء المؤشر) على بادرة الطماطة الملقحة بالبكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثيا (عينة المقارنة الموجبة)

C. بادرة الطماطة الملقحة بالماء المقطر المعقم (عينة المقارنة السالبة)

D. تكوين الورم التاجي (الجزء المؤشر) على بادرة زهرة الشمس الملقحة بالبكتريا *A. tumefaciens* البرية.

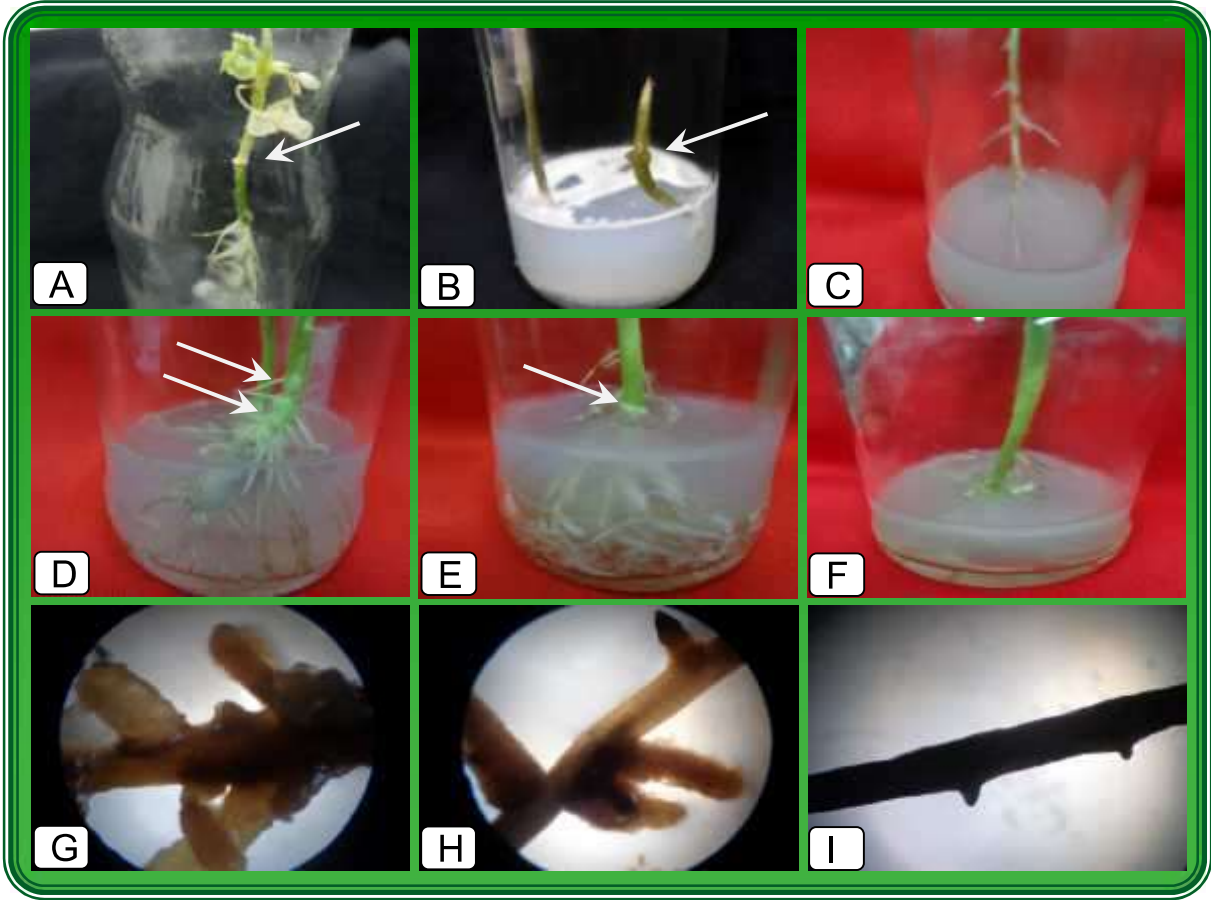
E. تكوين الورم التاجي (الجزء المؤشر) على بادرة زهرة الشمس الملقحة بالبكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثيا (عينة المقارنة الموجبة)

F. بادرة زهرة الشمس الملقحة بالماء المقطر المعقم (عينة المقارنة السالبة)

G. تكوين التراكيب الشبيهة بالاورام على جذور زهرة الشمس الملقحة بالبكتريا *A. tumefaciens* البرية تحت المجهر الضوئي (10×).

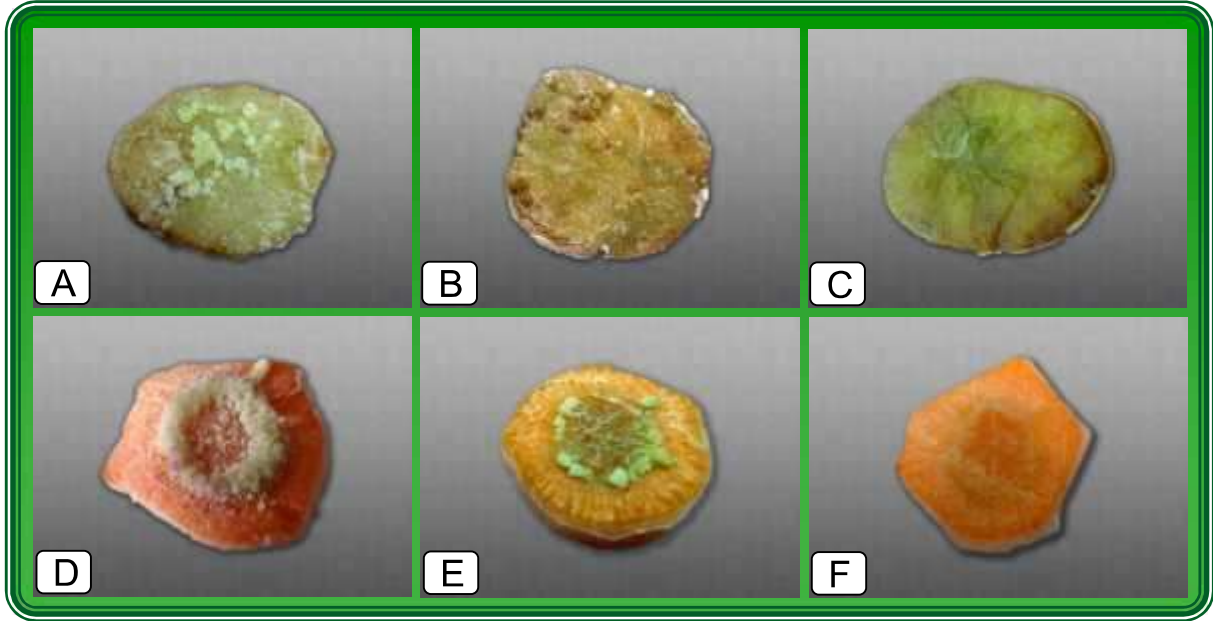
H. تكوين التراكيب الشبيهة بالاورام على جذور زهرة الشمس الملقحة بالبكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثيا (عينة المقارنة الموجبة) تحت المجهر الضوئي (10×)

I. جذر زهرة الشمس الملقحة بالماء المقطر المعقم تحت المجهر الضوئي (10×)



2.4.1.4 اختبار القدرة الإراضية على أقراص البطاطا والجزر

أظهرت نتائج العدوى الإصطناعية لاختبار القدرة الإراضية للبكتريا المعزولة عند اجراء الحقن المباشر لأقراص البطاطا والجزر أظهرت قدرتها على تكوين الأورام عليها بعد (25) و (34) يوماً من الاصابة على التوالي (الجدول14)، إذ ظهرت الأورام على سطوح هذه الأقراص بشكل نتوءات وباللون متباينة بين اللون الأخضر والأبيض. أما بكتريا (معاملة المقارنة)⁺ فقد أبدت قابلية على تكوين الأورام على أقراص البطاطا بعد (22) يوماً (الشكل 10)، وعلى أقراص الجزر بعد (38) يوماً في حين لم يظهر اي استجابة على الأقراص المحقونة بالماء المعقم (معاملة المقارنة)⁻.



الشكل (10) اختبار القدرة الامراضية *A. tumefaciens* للبكتريا البرية ومعاملة المقارنة على اقراص البطاطا والجزر

A. تكوين الاورام على اقراص البطاطا الملقحة ببكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) البرية

B. تكوين الاورام على اقراص البطاطا الملقحة ببكتريا (*A. tumefaciens*) (C58C1) المحولة وراثيا (عينة المقارنة الموجبة)

C. أقراص البطاطا الملقحة بالماء المقطر المعقم (عينة المقارنة السالبة)

D. تكوين الاورام على اقراص الجزر الملقحة ببكتريا (*A. tumefaciens*) (AtMcol) البرية (I)

E. تكوين الاورام على اقراص الجزر الملقحة ببكتريا (*A. tumefaciens*) (C58C1) المحولة وراثيا (عينة المقارنة الموجبة)

F. أقراص الجزر الملقحة بالماء المقطر المعقم (عينة المقارنة السالبة)

5.1.4 الإختبارات الكيموحيوية لتحديد الطراز الحيوي

بعد التأكد من قابلية البكتريا المعزولة على احداث الأمراض وتكوين الأورام على النباتات المختبرة اجريت الإختبارات الكيموحيوية لتحديد الطراز الحيوي لها وأظهرت النتائج انتماء هذه البكتريا الى الطراز الحيوي الأول Biovar I لامتلاكها القدرة على الحركة حين زراعتها على وسط الحركة Motility test medium ذي الأس الهيدروجيني (7) pH وانتشار نموها على الوسط الزراعي وقابليتها على انتاج انزيم الأوكسيديز، وانتاجها للحامض من تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر عند تخميرها لسكري السكروز والميلزيتوز، وتحملها لتراكيز متباينة (1 و 2%) من كلوريد الصوديوم (NaCl) حين زراعتها على وسط AMM هذا فضلاً عن ايجابيتها في انتاج 3 كيتولاكتوز على وسط أكار اللاكتوز بعد غمر الأطباق النامية بمحلول Bendor's reagent بدلالة تكوين حلقة صفراء بقطر (2-3) سم حول المستعمرات النامية، وجاءت جميع النتائج مطابقة لعينة المقارنة (البكتريا القياسية). وأبدت كل من البكتريا المعزولة وعينة المقارنة نتيجة سلبية في انتاجها للحامض على وسط PDA المدعم بكاربونات الكالسيوم الجدول (15) من ظهور الوسط بلون غامق حول المستعمرات، وهذا يدل على ان البكتريا المحولة وراثياً تعود ايضاً الى Biovar I علماً انها غير واردة ضمن تشخيصها من المصدر الذي حصل عليها منه.

الجدول (15) الإختبارات الكيموحيوية والتشخيصية لتحديد الطراز الحيوي Biovar للبكتريا المعزولة والمحولة وراثياً (القياسية)

عزلات البكتريا		الإختبارات الكيموحيوية
<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)	
+	+	Motility at PH (7)
+	+	Oxidase reaction
+	+	Sucrose
+	+	Melizitose
+	+	1 %
+	+	2 %
+	+	3-keto lactose Production
+	+	Pathogenicity test
-	-	Acid-clearing in PDA-CaCO ₃
+	+	Growth at 35°C

2.4 عزل بكتريا الرايزوبيوم من العقد الجذرية لنباتات الجت *M. sativa* وتشخيصها

1.2.4 الصفات المورفولوجية والزراعية لبكتريا الرايزوبيوم المعزولة

تميزت المستعمرات المنفردة النامية على الأطباق الحاوية على وسط YEM الصلب لجميع العزلات بلونها الكريمي وشكلها الدائري وسطحها المرتفعة وبحافتها الملساء وبقوامها المخاطي. وظهرت خلاياها عصوية سالبة لصبغة كرام حين فحصها بالمجهر الضوئي المركب باستخدام العدسة الزيتية (100X).

2.2.4 الإختبارات الكيموحيوية

يظهر من نتائج الجدول (16) ان عزلات بكتريا *S.meliloti* الأربع (Rh4, Rh3, Rh2, Rh1) تمتلك القدرة؛ على الحركة حين زراعتها على وسط SIM media الذي لوحظ منتشراً على طول خط الوخز، ونتاجها لانزيم الكاتليز والأوكسيديز نتيجة لتلوين ورقة الترشيح المشبعة بكاشف الأوكسيديز باللون البنفسجي ، ولكنها كانت سالبة لاختبار استهلاك السترات، فضلاً عن أنها كانت غير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين، وموجبة في انتاجها للحامض لقدرتها على تخمير كل من الكلوكوز والسكروروز بتحويل لون الوسط الى الاصفر دون سكر المالتوز.

وعند زراعة العزلات الأربع لبكتريا الرايزوبيوم على وسط YEM الصلب الحاوي على 0.0025 % من صبغة Congo red لوحظ تلون المستعمرات البكتيرية والتقاطها لصبغة Congo red المضافة الى وسط YEM الصلب ، وأظهرت تحملاً للتراكيز (1 و 2) % من كلوريد الصوديوم.

هذا فضلاً عن تلون المستعمرات البكتيرية باللون الأزرق نتيجة لالتقاطها لصبغة Aniline blue المضافة الى وسط YEM الصلب بتركيز (0.02)%. هذا فضلاً ايضاً عن قابلية هذه البكتريا على الفلورة عند فحصها بجهاز UV light Transillumintor بعد نموها على وسط King medium، في حين كانت سالبة لاختبار قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز لعدم تكوينها للحلقة الصفراء حول المستعمرات حين غمر الطبق بمحلول Bendor's reagent.

الجدول (16) الإختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *S.meliloti* قيد الدراسة

استجابة البكتريا المعزولة				الإختبارات
Rh4	Rh3	Rh2	Rh1	
+	+	+	+	Motility
+	+	+	+	Oxidase
+	+	+	+	Catalase
-	-	-	-	Citrate utilization
-	-	-	-	H ₂ S production
+	+	+	+	Glucose
+	+	+	+	Sucrose
-	-	-	-	Maltose
				Acid from
+	+	+	+	Congored
+	+	+	+	1 %
+	+	+	+	2 %
				Sodium chloride tolerance
+	+	+	+	Fluorese in king medium
-	-	-	-	3-ketolactose production
+	+	+	+	Production of cyclic B (1-3) glucans

3.2.4 اختبار التخصص العائلي لبكتريا الرايزوبيا المعزولة

بعد الحصول على عزلات بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية للنباتات (الجت باصنافه الأربعة: العراقي، البلجيكي، الباكستاني والأمريكي) وبعد تحضير اللقاح البكتيري كما ذكر في الفقرة (4.3.4.3) وتلقيح المجموع الجذري لهذه الأصناف بعزلات الرايزوبيا (Rh1، Rh2، Rh3 و Rh4) تمت عملية الفحص الدوري للأطباق الحاوية على بادرات الجت الملقحة بالعزلات الاربع من بكتريا *S. meliloti* لمتابعة مراحل تكوين العقد الجذرية، ابتداء من تشوه الشعيرات الجذرية بالمجهر الضوئي المركب، بأشكال ملتوية او ملتفة تعرف بـ(خطاف الراعي) ثم تكوين العقد الأولية والناضجة بعد مرور اسبوعين الى 3 أسابيع من التلقيح وكالاتي:

1.3.2.4 تكوين العقد الجذرية في بادرات الجت الملقحة ببكتريا (*S.meliloti* (Rh1) المعزولة من نباتات الجت (الصنف العراقي)

أظهرت نتائج تلقيح بادرات الجت باصنافه الاربعه (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الأمريكي) ببكتريا *S.meliloti* المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف العراقي)

تشوهات واضحة للشعيرات الجذرية انتهت بتكوين عقد جذرية على الجذر الرئيس لجميع الأصناف وعلى الجذور الجانبية للصنفين الباكستاني والأمريكي وبمعدل (6، 3، 2، 2) عقدة/نبات على التعاقب، وسجل الصنف العراقي أعلى نسبة للنباتات المكونة للعقد إذ بلغت (76%) في حين سجل الصنف الباكستاني أدنى نسبة مئوية وبلغت (60%) و تفاوتت أعداد الأفرع الخضرية من صنف الى آخر (4، 4.5، 5) فرع/نبات على التعاقب مع تباين معدلات ارتفاع المجموع الخضري (الجدول 17)، وأشكال العقد المتكونة عليها التي تميزت بشكلها المتفرع في بادرات (الصنف العراقي) والأقرب للكروي في كل من صنف (الباكستاني والأمريكي) والمتطاوّل في الصنف (البلجيكي) كما هو واضح أيضا في الشكل (11) وقد انعكس ذلك على المحتوى البروتيني للمجاميع الخضرية الذي بلغ (4.6، 4.2، 3.5، 4.2) ملغم/غم على التعاقب (الشكل 13)

الجدول (17) العقد الجذرية لأصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh1)

أصناف الجت	عدد البادرات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	النباتات المكونة للعقد %	موقع العقدة	شكل العقدة	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)
العراقي	19	6	76	الجذر الرئيسي	متفرع	4	6
البلجيكي	18	3	72	الجذر الرئيسي	متطاوّل	5	10
الباكستاني	15	2	60	الجذر الجانبي	أقرب للكروي	4	7
الأمريكي	16	2	64	الجذر الجانبي	أقرب للكروي	5	5

* معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة

2.3.2.4 تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh3) المعزولة من نباتات الجت (الصنف الباكستاني)

أبدت جميع أصناف الجت (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الأمريكي) تغيرات واضحة في شعيراتها الجذرية الملقحة ببكتريا *S. meliloti* المتخصصة المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف الباكستاني) محولة أياها من الشكل المستقيم الى الشكل المشوه

،اذاستجابت اصناف الجت الملقحة بهذه البكتريا جميعها على تكوين العقد الجذرية التي بلغت أعدادها (1، 2، 3، 5) عقدة/ نبات على التعاقب (الجدول18)، التي تباينت في اشكالها فمنها شبه الكروي المتكونة على جذور بادرات الجت بصنفيه (البلجيكي والأمريكي) ومنها المتطاوول المتكونة على جذور بادرات الجت للصنف العراقي ومنها (شبه الكروي والمتطاوول) على جذور بادرات الجت (الصنف الباكستاني) كما في الشكل (11). وتظهر النتائج اختلافاً واضحاً في النسب المئوية لتكوين العقد، إذ ابدى الصنف الامريكي أعلى نسبة لتكوين العقد عند التلقيح بالبكتريا المعزولة من جذور الصنف الباكستاني وهي (80)% في حين أظهرت بادرات الجت (الصنف العراقي) أدنى نسبة لتكوين العقد اذ بلغت (44)% ودفعت ذلك الى تباين أعداد الأفرع الخضرية في البادرات الملقحة بهذه البكتريا والذي بلغ (5) أفرع/نبات في حالة الجت (الامريكي)، نتيجة لارتفاع المحتوى البروتيني فيه الى (4.4) ملغم/غم وثلاثة افرع للصنفين البلجيكي والعراقي على التوالي ، وأظهرت النتائج ان العقد المتكونة كانت قد تكونت على الجذور الجانبية في حالتي الجت (الصنف الباكستاني، والبلجيكي) في حين اقتصر تكوينها على الجذور الرئيسية في حالتي الجت للصنف (العراقي، الامريكي) كما في الشكل (11).

الجدول (18) العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh3)

أصناف الجت	عدد البادرات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	% للنباتات المكونة للعقد	موقع العقدة على الجذر	شكل العقدة	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)
العراقي	11	1	44	الرئيسي	متطاوول	3	7.8
البلجيكي	12	2	48	الجانبى	كروي	3	7.5
الباكستاني	15	3	60	الجانبى	كروي ، متطاوول	5	6.0
الأمريكي	20	5	80	الرئيسي	اقرب للكروي	5	4.5

* معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة

الشكل (11) العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت *M.sativa* (باصنافه الاربعة) الملقحة بعزلات بكتريا *S. melilloti* (Rh3, Rh1) على التعاقب.

F-A العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. melilloti* (Rh1).

A. العقدة الجذرية لمتفرعة (الجزء المؤشر) المتكونة على بادرات الجت (الصف العراقي) بعمر اسبوعين.

B. الجذر الرئيس لبادرة الجت الصف العراقي بعمر اسبوعين وتظهر فيها العقدة الجذرية المتفرعة (الجزء المؤشر).

C. عقدة جذرية متفرعة ناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصف العراقي.

D. عقدة جذرية متطاولة ناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصف البلجيكي.

E. عقدة جذرية كروية ناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصف الباكستاني.

F. عقدة جذرية كروية ناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصف الامريكي.

L-G العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. melilloti* (Rh3)

G. العقد الجذرية (الجزء المؤشر) المتكونة على الجذور الجانبية لبادرات الجت (الصف الباكستاني).

H. العقد الجذرية الناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصف الباكستاني.

I. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصف العراقي.

J. العقد الجذرية شبه الكروية الناضجة (40×) على الجذور الجانبية للصف البلجيكي.

K. الجذر الرئيس لبادرات الجت الصف الامريكي بعمر اسبوعين وتظهر فيها العقد الجذرية على.

L. العقد الجذرية الكروية الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصف الامريكي.

(المتناول) على جذور البادرات للصفن الباكستاني والبلجيكي والأمريكي، وظهر تباين في حجم هذه العقد من صنف نباتي إلى آخر (الشكل 12).

ومن ناحية أخرى تكونت العقد الجذرية على الجذور الرئيسي للبادرات الملقحة بهذه البكتريا باستثناء جذور البادرات الجت للصفين البلجيكي والامريكي التي تكونت فيها العقد على الجذور الجانبية ويظهر من النتائج قدرة البكتريا من تثبيت النتروجين الجوي في مختلف العقد المتكونة على جذور البادرات لاصناف الجت المختلفة بتثبيتها للنتروجين بمستويات متباينة تراوحت ما بين (2.6-4.6) ملغم/غم (الشكل 13)، وتباينت بادرات الجت باصنافه الأربعة في معدل ارتفاع مجموعها الخضري الذي كان (9، 8.6، 6، 6.2) سم على التوالي مع اختلاف في اعداد الأفرع الخضرية التي بلغ معدل اعدادها في بادرات الجت الملقحة وباصنافه الأربعة حوالي (5، 5، 3، 4) فرع/نبات على التوالي. وانعكس على المحتوى البروتيني للمجاميع الخضرية، فقد سجل أعلى محتوى بروتيني (4.6) ملغم/غم في بادرات الجت الصنف البلجيكي الملقحة بالبكتريا *S. meliloti* (Rh₂).

الجدول (19) العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh₂)

معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)	عدد الأفرع الخضرية/نبات	شكل العقدة	موقع العقدة على الجذر	النباتات المكونة للعقد %	معدل عدد العقد/نبات	عدد البادرات المكونة للعقد	أصناف الجت
9	5	اقرب للكروي	الرئيسي	72	3	18	العراقي
8.6	5	متناول	الجانبى	84	5	21	البلجيكي
6	3	متناول	الرئيسي	48	1	12	الباكستاني
6.2	4	متناول	الجانبى	52	2	13	الأمريكي

* معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة

4.3.2.4 تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh4) المعزولة من نباتات الجت (الصنف الأمريكي)

أبدت أصناف الجت جميعها (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الأمريكي) تشوهات واضحة في شعيراتها الجذرية الملقحة ببكتريا *S. meliloti* المتخصصة المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف الأمريكي) مما حفز على تكوين العقد الجذرية عليها ويمعدل (3، 2، 1، 2) عقدة/ نبات على التعاقب كما هو واضح في الجدول (20)، وبلغت أعلى نسبة لتكوين العقد الجذرية (68%) لبادرات الجت (الصنف العراقي) تلاها كل من (الأمريكي، البلجيكي) بنسبة (65،60%) على التعاقب، وكان أدناها نسبة (44%) في بادرات الجت الباكستاني، وتباينت هذه العقد في اشكالها، إذ أخذت العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت باصنافه (العراقي، الأمريكي والبلجيكي) الشكل المتطاول، في حين كانت ذات شكل شبه كروية في حالة الجت (الصنف الباكستاني) كما في الشكل (12)، واختلفت اعداد الأفرع الخضرية والتي تراوحت ما بين (2-4) أفرع للنباتات المكونة للعقد، مما أدى الى ارتفاع المستوى البروتيني في المجموع الخضري للبادرات الملقحة بهذه البكتريا الذي سجل (4.3، 4.1، 4.7، 2.5) ملغم/غم على التعاقب. وأظهرت نتائج التلقيح لبادرات الجت جميعها باصنافه الأربعة والملقحة بالبكتريا *S. meliloti* المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف الأمريكي) تكوين هذه العقد الجذرية على الجذور الرئيسية لهذه البادرات.

الجدول (20) العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh4)

أصناف الجت	عدد البادرات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	% للنباتات المكونة للعقد	موقع العقدة على الجذر	شكل العقدة	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)
العراقي	17	3	68	الرئيسي	متطاول	4	8.0
البلجيكي	15	2	60	الرئيسي	متطاول	3	6.7
الباكستاني	11	1	44	الرئيسي	شبه كروي	2	5.5
الأمريكي	15	2	65	الرئيسي	متطاول	3	7.0

* معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة

الشكل (12) العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت *M.sativa* (باصنافه الاربعة) الملقحة بعزلات بكتريا *S. melilloti* (Rh4, Rh2) على التعاقب.

H-A. العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. (Rh2) melilloti*

A. العقدة الجذرية المتطاولة (الجزء المؤشر) المتكونة على بادرات الجت (الصنف الباكستاني) بعمر اسبوعين

B. الشعيرات الجذرية المشوهة .

C. جزء مكبر عن الشعيرات المشوهة المؤشرة في (B).

D. العقد الجذرية المتطاولة المتكونة على الجذر الرئيس لبادرة الجت (الصنف الباكستاني).

E. العقد الجذرية (الجزء المؤشر) المتكونة على الجذور الجانبية لبادرات الجت (الصنف البلجيكي).

F. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصنف البلجيكي.

G. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصنف الامريكي.

H. العقد الجذرية الاقرب للكروي للناضجة (40×) على الجذر الرئيسي للصنف العراقي.

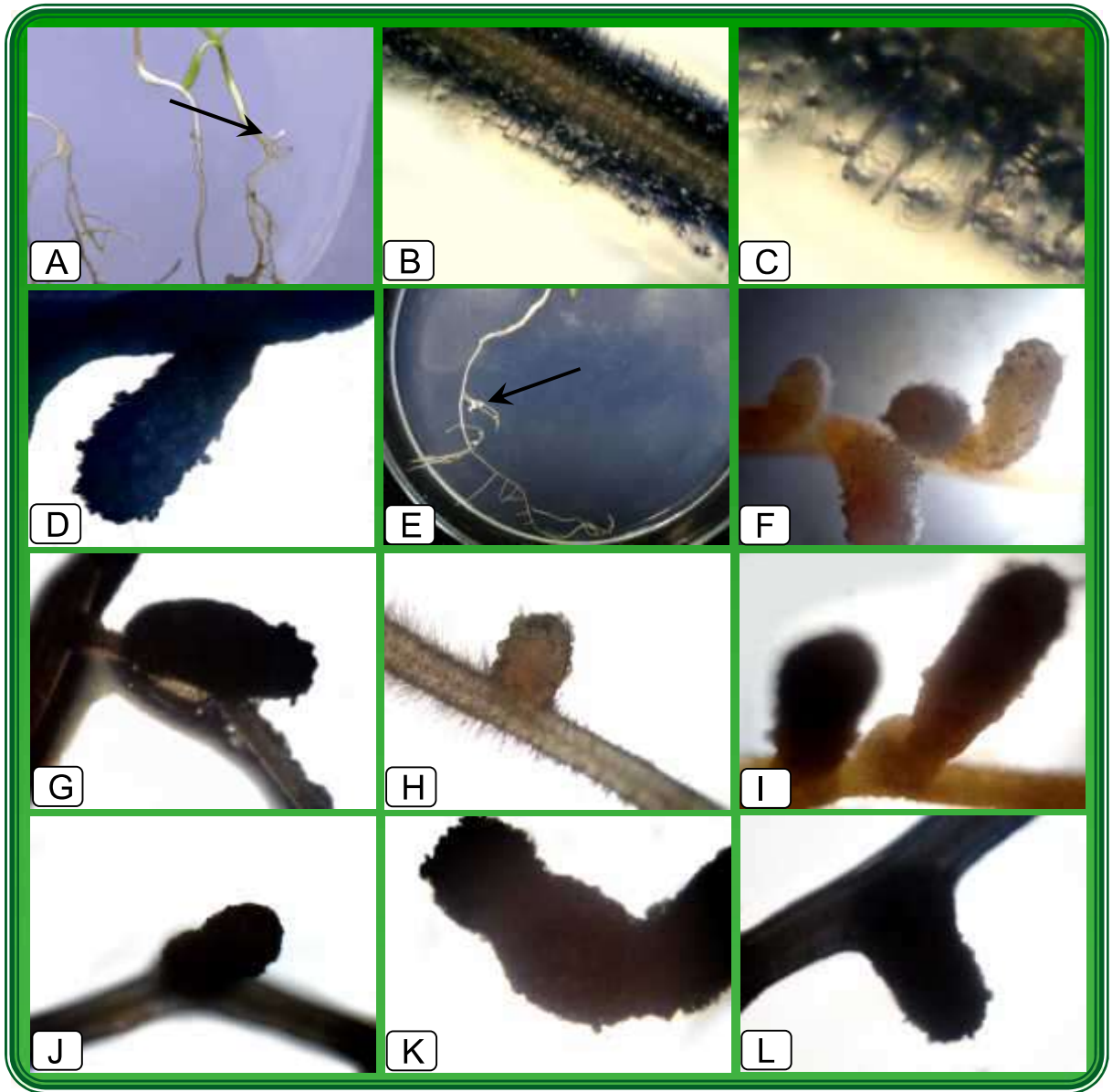
L-I. العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. melilloti* (Rh4)

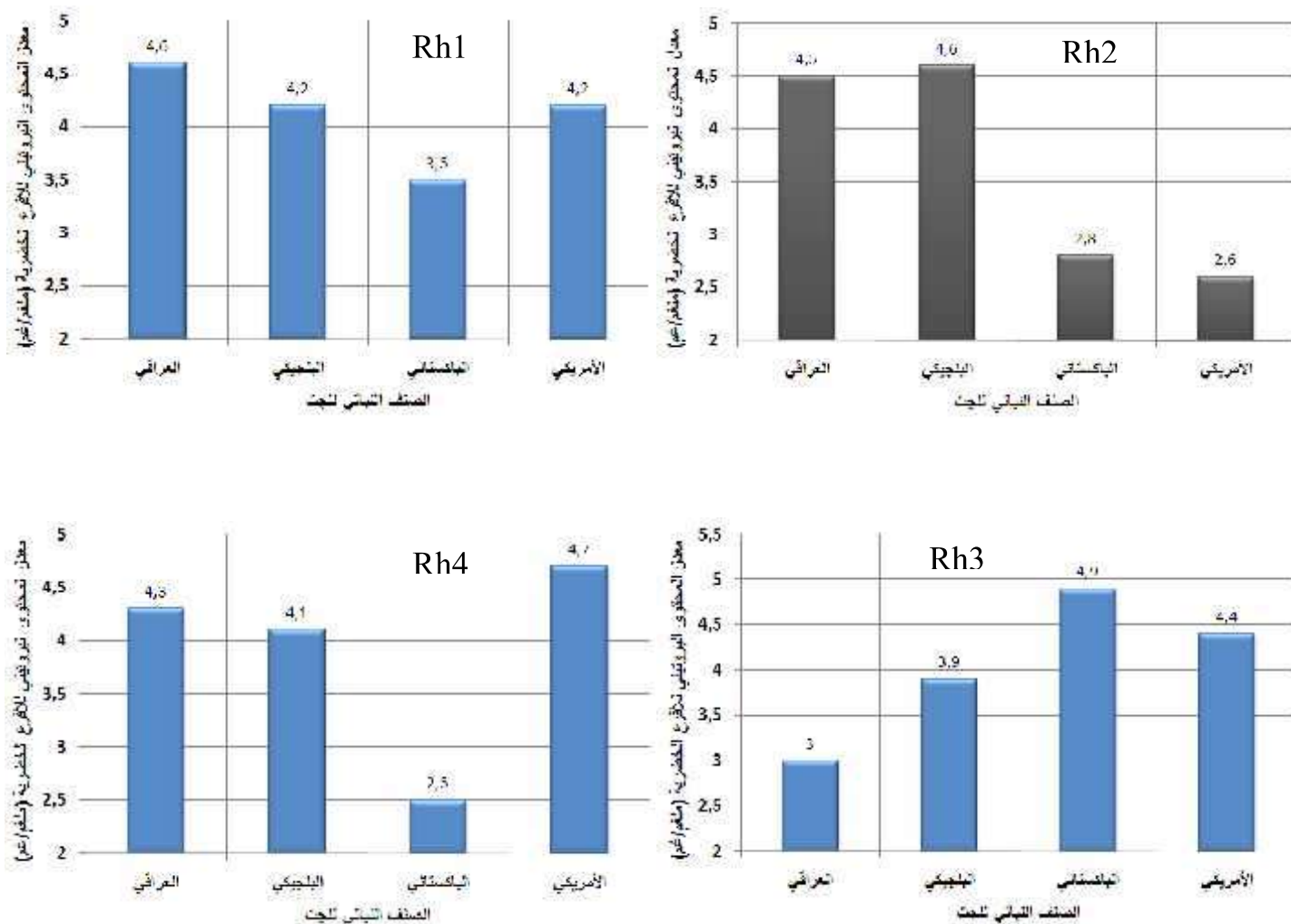
I. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف الامريكي.

J. العقدة الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف العراقي.

K. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف البلجيكي.

L. العقد الجذرية شبه الكروية الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف الباكستاني.





الشكل (13) يوضح تباين المحتوى البروتيني للأفرع الخضرية لأصناف الجت الملقحة بعزلات بكتريا *S. meliloti* (Rh4, Rh3, Rh2 , Rh1) المختلفة

5.3.2.4 تحديد كفاءة عزلات *S. meliloti* المعزولة على تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني لاصناف نباتات الجت الاربعة

ابدت عزلات (*S. meliloti* (Rh4, Rh3, Rh2 , Rh1) جميعها القابلية على تكوين العقد الجذرية على جذور بادرات الجت باصنافه الاربعة (الجدول 17-20) مع تباين كفاءة هذه العزلات (الجدول 21).

اذ سجلت العزلة (Rh1) أعلى نسبة مئوية للإصابة وبلغت 68% وتلتها العزلة (Rh2) وبلغت 64% مما انعكس على معدل ارتفاع عدد العقد/بادرة الذي تراوح ما بين (2-3.25) وارتفاع المحتوى البروتيني للبادرات الملقحة ورافقه ارتفاع معدل عدد الافرع الخضرية فيها.

الجدول (21) كفاءة عزلات بكتريا *S. meliloti* (Rh1, Rh2, Rh3, Rh4) في تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني لبادرات اصناف بادرات الجت *M. sativa*

العزلة البكتيرية	% للنباتات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل المحتوى البروتيني
Rh1	68%	3.25	4.50	4.10
Rh2	64%	2.75	4.20	3.60
Rh3	58%	2.75	3.75	4.05
Rh4	59%	2.00	3.00	3.90

6.3.2.4 التأكد من كفاءة البكتريا المعزولة من العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت

تبين من عزل العقد المتكونة على جذور بادرات الجت بأصنافه الاربعة (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الامريكي) الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh4, Rh3, Rh2, Rh1) المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت الحقلية بعد التأكد من كفاءة تعقيمها بنموها على الوسط YEM الصلب وقدرتها على تكوين العقد الجذرية على بادرات الجت مرة ثانية.

ثانياً: إنتاج نباتات الجت *M.sativa* من كالس مزارع السيقان تحت الفلقية

3.4 كفاءة الحصول على بادرات الجت المعقمة من البذور

أظهرت بيانات عمر بذور الجت بأصنافه الأربعة (العراقي، البلجيكي، الباكستاني و الأمريكي) في محلول هايپوكلورايت الصوديوم NaOCl بتركيز 2% لمدد زمنية مختلفة (5، 10، 15) دقيقة وتعقيمها سطحياً وتكوينها للبادرات السليمة أظهرت أعلى نسبة لانبات البذور في المدة 5 دقائق، وبلغت (100 ، 98 ، 86 ، 75) % في بادرات الجت العراقي و البلجيكي والباكستاني و الأمريكي على التعاقب حين زراعتها على وسط NF الصلب، وسط MS الصلب بعد 24 ساعة من تمام الانبات، ولوحظ ان استعمال المدد الزمنية (10، 15) دقيقة أدى الى موت عدد كبير من البادرات حين شروعها في الإنبات (الجدول 22).

الجدول (22) كفاءة التعقيم السطحي لبذور نباتات الجت باستعمال هايپوكلورايت الصوديوم بتركيز (2%) (5) دقائق في تكوين البادرات السليمة

أصناف الجت	عدد البذور المعاملة	إنبات البذور (%)	عدد البادرات السليمة
العراقي	100	100	100
البلجيكي	100	98	98
الباكستاني	100	86	81
الأمريكي	100	75	60

4.4 تكوين مزارع كالس الاجزاء النباتية

أبدت قطع الاجزاء النباتية (الأوراق ، السيقان تحت الفلقية والجذور) لبادرات الجت قابلية متباينة لاستحداث الكالس في مدة تراوحت ما بين (19-35) يوم من زراعتها على مجموعة من أوساط الإستحداث متمثلة بأملح وسط MS الصلب المدعم بتداخلات متباينة من منظمات النمو (الجدول 23) وتشير البيانات الواردة في الجدول إلى الدور الأساسي للتداخلات المشتركة بين الأوكسين والساييتوكاينين في استحداث الكالس، إذ أظهرت النتائج تفوق الوسط kin 0.1 ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D1.0 ملغم.لتر⁻¹ MS⁺ عن بقية الأوساط المنتخبة بدلالة نسبته 90% المتحققة في استحداث كالس الاوراق، في 21 يوماً من زراعتها تلاه الوسط kin 0.2 ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D1.0 ملغم.لتر⁻¹ MS⁺ عن بنسبة استحداث 83.3% وكذلك الوسط kin 2.0 ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D2.0 ملغم.لتر⁻¹ MS⁺ عن بقية التداخلات المنتخبة لاستحداث كالس السيقان تحت الفلقية بعد 19 يوماً من زراعتها والوسط kin 2.0 ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D1.0 ملغم.لتر⁻¹ MS⁺ عن بقية الاوساط المختبرة لاستحداث كالس الجذور بنسبة استحداث 100% بعد D ملغم.لتر⁻¹ MS⁺ عن بقية الاوساط المختبرة لاستحداث كالس الجذور بنسبة استحداث 100% بعد

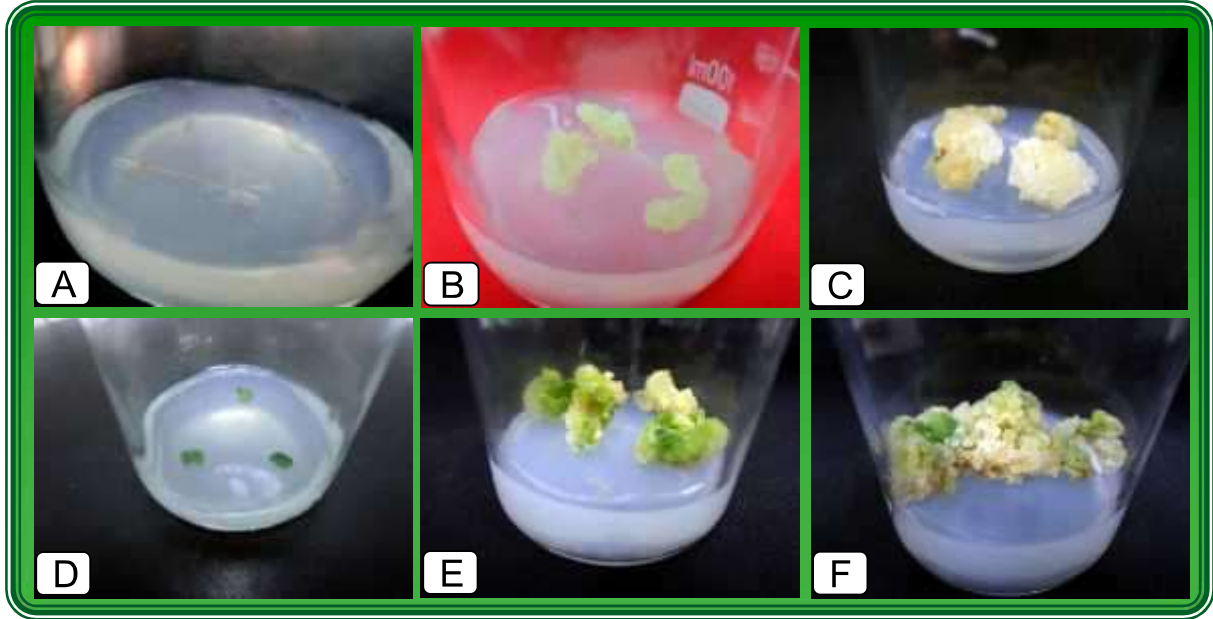
20 يوماً من زراعتها فضلاً عن تسجيل الوسط 3.0 kin ملغم. لتر⁻¹ 2,4-D0.5+ ملغم. لتر⁻¹ MS+ نسبة استحداث 90% بعد 21 يوماً من زراعتها على الوسط ، مروراً باستحداث قطع هذه الاجزاء وانقساماتها المتتالية منتجة كتلاً خلوية عديدة غير متميزة ترتب عنها اختفاء معالم الجزء النباتي بالكامل. واتصفت مزرعة كالس الاوراق ببنيته المتماسكة ولونه الاخضر ووفرة كميته (الشكل 14)، في حين اتصف كالس السيقان تحت الفلقية والجذور ببنيته الهشة ولونه الكريمي.

الجدول (23) تأثير مجموعة من تداخلات منظمات النمو في وسط الاستحداث MS الصلب في تكوين مزارع كالس الاجزاء النباتية المستأصلة من بادرات الجت *M.sativa* المعقمة

الاجزاء النباتية						أوساط الإستحداث ملغم.لتر ⁻¹
الجذور		السيقان تحت الفلقية		الاوراق		
مدة الإستحداث (يوم)	إستحداث الكالس (%)	مدة الإستحداث (يوم)	إستحداث الكالس (%)	مدة الإستحداث (يوم)	إستحداث الكالس (%)	
-	-	-	-	-	-	MSO (المقارنة)
-	-	-	-	29	60	MS+0.1 2,4-D+0.5Kin
-	-	-	-	28	70	MS+0.5 2,4-D+0.5Kin
-	-	-	-	32	60	MS+0.5 2,4-D+1.0Kin
27	73.3	35	46.6	-	-	MS+0.5 2,4-D+2.0Kin
28	50	-	-	-	-	MS+0.25 2,4-D+3.0Kin
21	90	33	10	33	30	MS+0.5 2,4-D+3.0Kin
-	-	-	-	21	90	MS+1.0 2,4-D+0.1Kin
-	-	-	-	26	83.3	MS+1.0 2,4-D+0.2Kin
-	-	-	-	31	50	MS+1.0 2,4-D+0.5Kin
20	100	31	55	24	80	MS+1.0 2,4-D+2.0Kin
19	93.3	30	26.6	32	50	MS+1.0 2,4-D+3.0Kin
-	-	25	73.3	-	-	MS+1.5 2,4-D+3.0Kin
-	-	19	83.3	34	30	MS+2.0 2,4-D+2.0Kin
30	33.3	30	63	-	-	MS+2.0 2,4-D+2.0Kin+2.0NAA
35	30	32	16.6	-	-	MS+0.5NAA+1.0BA
28	53.3	29	40	-	-	MS+4.0NAA+2.0BA

عدد القطع المزروعة 30 قطعة/ معاملة

واظهرت النتائج فشل التداخلات الأخرى من منظمات النمو كالتداخلات بين BA & NAA في تحقيق نسب استحداث عالية للكالس، إذ بلغت أعلى نسبة استحداث فيها لكالس الجذور 53.3% تلاه كالس السيقان تحت الفلجية 40% حين تنمية هذه الاجزاء على وسط 2.0BA+1- ملغم. لتر + 4.0NAA+1- ملغم. لتر MS في حين فشلت في تحقيق أي نسبة استحداث لكالس الاوراق في التداخلات المذكورة انفاً.



الشكل (14) تكوين مزارع الكالس من جذور واوراق نباتات الجت *M. sativa*

- A. قطع جذور الجت بعمر اربعة اسابيع في الوسط 2,4-D 1.0+ Kin 2.0+ MS
 B. مزرعة كالس الجذور بعمر (30) يوماً
 C. مزرعة كالس الجذور بعمر (45) يوماً
 D. قطع الاوراق بعمر اربعة اسابيع في الوسط 2,4-D 1.0+ Kin 1.0+ MS
 E. مزرعة كالس الاوراق بعمر (30) يوماً
 F. مزرعة كالس الاوراق بعمر (45) يوماً

5.4 إءامة كالس الأءزاء المءءلفة لءاءرات الجء وءءقءر الأوزان الطرية لكالس

ببئء النئائء أن أفضل وسط لءامة كالس الأوراق كان وسط MS الصلب مءءماً بـ 0.1kin ملءم.لئر⁻¹+2,4-D1.0 ملءم.لئر⁻¹، فئ ءئن كان أفضل وسط لءامة كالس السئقان ءءء الفلقئة هو وسط MS الصلب مءءماً بـ 2.0kin ملءم.لئر⁻¹+2,4-D2.0 ملءم.لئر⁻¹، أما أفضل وسط لءامة كالس الجءور فكان وسط MS الصلب مءءماً بـ 2.0kin ملءم.لئر⁻¹ وذلك لءءفاظ كالس الأءزاء النباتئة بءئوءئءه بإسءمرار زراعءه على هءه الأوساط وإءءءءت الزراعة كل شهر إءءماءاً على بءء ظهور البقع البئئة وجفاف الوسط الغءائئ وءءشقءه.

وئظهر نئائء الجءول (24) أن مءءل الأوزان الطرية لكالس الأءزاء المءءلفة على الأوساط المئءءبة لنمو كالس كل جزء نباتئ واستءءاءه ولءءلءة مءررات فئ مءء نمو 30 يوماً .

الجءول (24) ءءقءر الأوزان الطرية لكالس الأءزاء المءءلفة لنباءات الجء على وسط MS الصلب مءءماً بإءافة ءرالكئز المئءءبة لكل جزء نباتئ ءلال فءرة نمو 30 يوماً

مءءل الوزئ الطرئ (غم)	الوسط الغءائئ (ملءم.لئر ⁻¹)	مصدر الكالس
3.0	MS +2,4-D 1.0+Kin 0.1	الأوراق
2.5	MS +2,4-D 2.0+Kin 2.0	السئقان ءءء الفلقئة
2.7	MS +2,4-D 1.0+Kin 2.0	الجءور

* الارقام ءمءل مءءل ءلءة مءررات/ مءاملة

6.4 إسءءمال وسط B5

أظهرء نئائء اسءءمال وسط B5 الصلب (ءاوءئ على ءءاءءلات نفءها من منءمءات النمو السابئة فئ وسط MS) لاءلائم ءكوئن الكالس من قءع الأوراق والسئقان ءءء الفلقئة والجءور، وقء ظهرء على هءه القءع علاماء الإسوءاء والءبؤل والموء بعء 10-12 يوماً من الزراعة على هءا الوسط.

7.4 إنتاج الأفرع الخضرية لنباتات الجت *M.sativa*

1.7.4 تكوين الأفرع الخضرية من كالس السيقان تحت الفلقية

أظهر الوسط 2.0kin ملغم.لتر⁻¹ 2,4-D 2.0+¹ ملغم.لتر⁻¹ MS+¹، مقدرة متميزة على استحداث الكالس من السيقان تحت الفلقية وعلى تكوين الأفرع الخضرية منه بمقدار 3 أفرع لكل قطعة كالس كما في الشكل (15) وبنسبة مئوية قدرت بحوالي 20% وبمرحلة واحدة One step regeneration في مدة 23 يوماً من زراعة قطعة السيقان تحت الفلقية على سطح الوسط المذكور (الجدول 25). في حين فشلت بقية الأوساط في دعم تمايز كالس هذا الجزء النباتي وبقية الأجزاء الأخرى (الأوراق، الجذور، العقد الجذرية)، إذ باشرت قطع كالس السيقان تحت الفلقية بتكوين تراكيب دقيقة خضراء اللون تطورت مع استمرار نموها إلى أفرع خضرية بعد 23 يوماً من الزراعة على سطح الوسط المذكور وأظهرت النتائج كفاءته في إنتاج هذه الأفرع الخضرية.

الجدول (25) تكوين الأفرع الخضرية لنباتات الجت *M.sativa* من تمايز كالس السيقان تحت الفلقية بمرحلة واحدة

التمايز (%)	مدة بدء تكوينها (يوم)	معدل عدد الأفرع/قطعة	عدد الأفرع الكلية	عدد قطع الكالس المزروعة/المتمايزة	أوساط التمايز (ملغم/لتر)
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0/30	MS0 (المقارنة)
20	23	3	24	8/40	MS+ 2,4-D 2.0+Kin 2.0

2.7.4 الصفات المظهرية للنباتات الناتجة من كالس السيقان البذرية

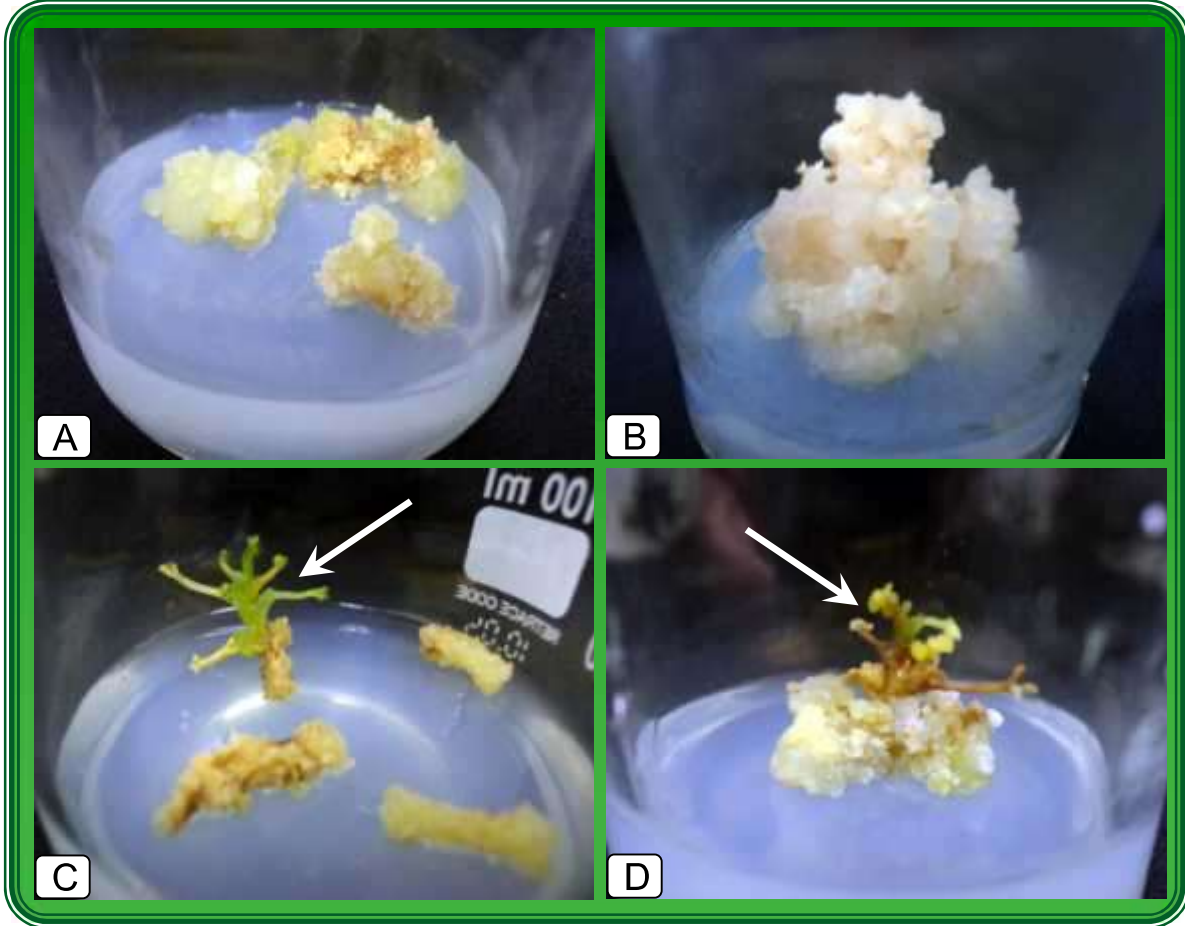
أظهرت نتائج المقارنة بين مجموعتين من النباتات، الناتجة أولها من كالس السيقان تحت الفلقية وثانيهما من البذور، حصول اختلافات مظهرية واضحة كما في الجدول (26).

الجدول (26) الصفات المظهرية للنباتات الناتجة من مزارع كالس السيقان تحت الفلقية ونظيرتها الناتجة من البذور

النباتات البذرية	النباتات الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية	الصفات
15	7	ارتفاع النبات (سم)
3	6	عدد الأفرع
9	12	عدد الأوراق
رفيع أو أقل سمكاً	سميك	سمك الساق

3.7.4 تجذير الافرع الخضرية

أظهرت نتائج استعمال وسط MS 1/2 + MSO الصلب الحاوي على مختلف التداخلات الوارد ذكرها في الفقرة (2.3.7.3) إخفاقها في تجذير الافرع الخضرية الناتجة من كالس السيقان تحت الفلجية.



الشكل (15) تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلجية وتمايز نباتات الجت في الوسط الزرعي

A. مزرعة كالس السيقان تحت الفلجية بعمر (30) يوماً في الوسط 2,4-D 2.0+

Kin 2.0+ MS

B. مزرعة كالس السيقان تحت الفلجية بعمر شهرين في الوسط 2,4-D 2.0+ Kin

2.0+ MS

C. تكوين الافرع الخضرية الفتية (الجزء المؤشر) بعمر (15) يوماً من تمايز كالس

السيقان تحت الفلجية في (B)

D. تكوين الافرع الخضرية الفتية (الجزء المؤشر) بعمر (30) يوماً من تمايز كالس

السيقان تحت الفلجية في الوسط 2,4-D 2.0+ Kin 2.0+ MS

ثالثاً: الأنتقال الأفقي للجينات بين بكتريا *A. tumefaciens* & *S. meliloti* بالاقتران البكتيري

8.4 مقاومة بكتريا *Agrobacterium* و *Rhizobium* المعزولة للمضادات الحيوية

كشفت عن قابلية كل من الأروبيكتريوم (*A. tumefaciens* (AtMcol) المعزولة من الأورام التاجية لنباتات الآس (1.4.3) وعينة المقارنة (*A. tumefaciens* (C58C1) والرايزوبيوم (Rh4, Rh1, Rh2, Rh3) المعزولة من الأصناف الأربعة لنباتات الجت اتجاه حساسيتها او مقاومتها للمضادات الحيوية قيد الدراسة، إذ ابدت هذه الأروبيكتريوم المعزولة مقاومة لمعظم المضادات الحيوية (Cip, Chl, Str, Ert, Tri, Tet, Rif, Gen, Am & Amp) وحساسيتها للمضادات الحيوية (Kan, Cef) وجاءت هذه النتائج مطابقة لعينة المقارنة (*A. tumefaciens* (C58C1) باستثناء حساسيتها لخمس مضادات حيوية (Cip, Chl, Tet, Cef, Kin)، أما بكتريا الرايزوبيوم فقد أظهرت أيضاً مقاومتها تجاه (Cip, Chl, Str, Ert, Tri, Tet, Rif, Cef, Amo & Amp) وحساسيتها تجاه ثلاثة مضادات (Kan, Rif, Gen) باستثناء حساسية العزلتين (Rh4, Rh1) تجاه (Tri) والعزلتين (Rh3, Rh2) تجاه (Cip) كما هو مبين في الجدول (27)

الجدول (27) اختبار حساسية بكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً و *S. meliloti* المعزولة من نباتات الجت للمضادات الحياتية

<i>A. tumefaciens</i>		<i>S. meliloti</i>				المضادات الحيوية
(C58C1)	(AtMcol)	Rh4	Rh3	Rh2	Rh1*	
R	R	R	R	R	R	Amp
R	R	R	R	R	R	Amo
S	S	R	R	R	R	Cef
R	R	S	S	S	S	Gen
S	R	R	R	R	R	Tet
R	R	S	R	R	S	Tri
R	R	R	R	R	R	Ery
R	R	S	S	S	S	Rif
R	R	R	R	R	R	Str
S	R	R	R	R	R	Chl
S	R	R	S	S	R	Cip
S	S	S	S	S	S	Kan

R: مقاومة ، S : حساسية * اعتمدت العزلة Rh1 في تجارب التحديد والاقتران.

9.4 تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي في بكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً و *S. meliloti*

أجريت عملية التحييد لاختبار قابلية البكتريا على فقدان المقاومة للمضادات الحيوية تلقائياً أو بالطريقة المستحثة، تمهيداً لاجراء عمليات الإقتران بين الجنسين لنقل محتوى الـ DNA البلازميدي من بكتريا *S. meliloti* (Rh1) الى بكتريا الأروبيكتريوم البرية والمحولة وراثياً وبالعكس.

1.9.4 التحييد التلقائي Spontaneous curing

أظهرت نتائج اختبار قابلية عزلة *A. tumefaciens* (AtMco1) و *A. tumefaciens* (C58C1) و *S. meliloti* (Rh1) فقدان جينات المقاومة للمضادات الحيوية تلقائياً (الجدول 28)، وإن جميع العزلات التابعة للجنسين قد حدث فيها تحييد تلقائي لصفة المقاومة للمضادات الحيوية بمدى يتراوح ما بين (1-15) %، وكانت أعلى نسبة للتحييد (15) % في بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) للمضاد الحيوي Str، في حين سجلت أعلى نسبة تحييد (29) % ولجميع العزلات للمضاد Str وأقل نسبة تحييد (4) % للعزلات جميعاً كانت للمضاد الحيوي Amo. في حين أظهرت المستعمرات التابعة لبكتريا *S. meliloti* أعلى نسبة تحييد (12) % للمضاد الحيوي Chl وأقل نسبة تحييد (1) % للمضاد الحيوي Amo، بينما كانت النتائج متباينة لبقية المضادات الحيوية.

وأبدت العزلة *A. tumefaciens* (AtMco1) أعلى نسبة تحييد (14) % للمضاد الحيوي Rif وأقل نسبة تحييد (2) % كانت للمضادات الحيوية (Ery, Tet, Amo)، في حين أظهرت النتائج درجات متباينة لبقية المضادات الحيوية. ومن الجدير بالذكر ان اعلى نسبة تحييد للمضادات الحيوية واقلها قد ابدتها *A. tumefaciens* (AtMco1) و *S. meliloti* على التعاقب.

الجدول (28) تحديد مقاومة المضادات الحيوية في المستعمرات البكتيرية تلقائياً

عدد المستعمرات المحيطة تلقائياً (%)														
المضادات الحيوية (مايكروغرام/مل)														
	Kan (30)	Cip (30)	Ch1 (35)	Str (25)	Rif (250)100	Ery (15)	Tri (30)	Tet (30)	Gen (40)	Cef (30)	Amo (25)	Amp (10)		
عدد المستعمرات النامية على وسط Master plate	الوسط الغذائي												السلالة البكتيرية	
100	S	11	13	4	14	2	12	2	12	S	2	3	AMM	<i>A. tumefaciens(AtMcol)</i>
100	S	S	S	15	13	4	13	S	13	S	1	2	YEB	<i>A. tumefaciens(C58CI)</i>
100	S	3	12	10	S	2	S	9	S	R	1	2	YEM	<i>S.meliloti</i>

S: حساسة، R: مقاومة

2.9.4 التحديد المستحث باستعمال الأكردين البرتقالي

بعد استعمال عدة تراكيز من المحيد الكيميائي الأكردين البرتقالي وهي (250، 500، 750، 1000) مايكروغرام/مل لبكتريا *A. tumefaciens* وبالتراكيز (25، 50، 75، 100) مايكروغرام/مل لبكتريا *S. meliloti* للكشف عن التركيز القاتل لهذه العزلات البكتيرية، تبين أن التركيز (1000) مايكروغرام/مل كان فعالاً في عملية القتل لبكتريا *A. tumefaciens* والتركيز (100) مايكروغرام/مل فعال في قتل الرايزوبيوم لذا استعمل نصف التركيز القاتل وهو (500) مايكروغرام/مل و (50) مايكروغرام/مل من الأكردين البرتقالي لغرض تحييد كل من الأكرديوم والرايزوبيوم على التوالي. وكما جاء في الفقرة (2.2.6.3) من المواد وطرائق العمل واطهر التركيزين كفاءة في عملية التحييد وازالة محتوى DNA البلازميدي .

يتبين من النتائج أن جميع مستعمرات العزلات جميعاً قد حدثت فيها عملية تحييد لصفة المقاومة للمضادات الحيوية باستعمال الأكردين البرتقالي. علماً أن أعلى نسبة مئوية للتحديد كانت للمضاد الحيوي Rif (82%) في حين كانت أوطأ نسبة تحييد كانت للـ Ery (18%) في جنس *Agrobacterium*، أما مستعمرات *S. meliloti* فقد سجلت أعلى نسبة تحييد إذ بلغت (80%) للمضاد الحيوي (Chl) في حين كانت أقل نسبة تحييد (21%) للـ Str وكانت النتائج متباينة لبقية المضادات الحيوية. أما العزلة (*A. tumefaciens*(*AtMcol*) فقد ابدت أعلى نسبة تحييد للمضاد الحيوي Rif وواقع (78%)، في حين كانت أقل نسبة تحييد (18%) للمضاديين (Ery, Amp) .

وإظهرت النتائج تدرجات متباينة لبقية المضادات الحيوية، فضلاً عن اعطاء مستعمرات *A. tumefaciens*(*C58C1*) أقل نسبة في فقدان صفة المقاومة بلغت (21%) تجاه Ery وتباينت بقية النتائج ما بين (21-82%) لبقية المضادات الحيوية. ومن النتائج المارة يتبين أن (A-O) كان ذات كفاءة عالية في عملية التحييد لصفة المقاومة للمضادات الحيوية، وتشير النتائج أيضاً إلى أن العزلة *A. tumefaciens*(*C58C1*) أظهرت أعلى نسبة تحييد مقارنة بباقي العزلات البكتيرية الأخرى وبنسبة (49.7%) في حين أظهرت العزلة *S. meliloti* أقل نسبة تحييد (37.6%) قياساً بباقي العزلات وكما هو واضح من نتائج الجدول (29).

الجدول (29) تحديد مقاومة المستعمرات البكتيرية للمضادات الحيوية باستخدام الأكردين البرتقالي $500 \mu\text{g/ml}$ لـ *A.tumefaciens* و $50 \mu\text{g/ml}$ لـ *S.melliloti*

عدد المستعمرات المحيطة (%)												سلالة البكتيرية	
المضادات الحيوية (مايكروغرام/مل)											عدد المستعمرات النامية على Master plate		
Kan (30)	Cip (30)	Ch1 (35)	Str (25)	Rif (250)100	Ery (15)	Tri (30)	Tet (30)	Gen (40)	Cef (30)	Amo (25)		Amp (10)	
S	50	67	20	78	18	R	20	56	S	19	18	100	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)
S	S	S	68	82	21	R	S	74	S	26	23	100	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)
S	20	80	21	S	32	S	64	S	R	26	22	100	<i>S. melliloti</i>

S: حساسة، R: مقاومة

10.4 قابلية الـ DNA البلازميدي في بكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً و *S. meliloti* على الحركة والإنتقال الأفقي بالإقتران

أجريت عملية الإقتران لاختبار قابلية كل من (*AtMcol*) *A. tumefaciens* و *A. tumefaciens*(C58C1) على نقل مادتها الوراثية الى بكتريا *S. meliloti* (المستلمة) فضلاً عن الوقوف عند الدور الذي تلعبه البلازميدات المنقولة في امكانية نقل صفة تكوين الأورام التاجية والمقاومة للمضادات الحيوية في الخلايا البكتيرية المستلمة.

ولاجراء عملية الإقتران فقد انتخبت علائم وراثية قياسية، اذ يجب ان يكون هناك على الاقل عليمتان وراثيتان مختلفتان بين الخلايا البكتيرية (الأكروبيكتريوم) و(الرايزوبيوم).

1.10.4 الإقتران بين بكتريا *S. meliloti* (كخلايا واهبة) *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (بوصفها خلايا مستلمة).

أجريت عملية الإقتران لاختبار قابلية *S. meliloti* على نقل مادتها الوراثية الواقعة على بلازميداتها الى *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (المحيدة) وذلك لتوضيح الدور الذي تلعبه البلازميدات المنقولة افقياً في نقل صفتي المقاومة للمضادات الحيوية وتكوين العقد الجذرية من الرايزوبيوم كخلايا واهبة الى الاكروبيكتريوم كخلايا مستلمة.

اختيرت عليمتان وراثيتان مختلفتان بينهما تمثلتا بامتلاك البكتريا الواهبة لصفة المقاومة والحساسية للمضادين الحيويين Ch1 بتركيز (35) مايكروغرام/مل و Tri بتركيز (30) مايكروغرام/مل على التعاقب والعكس صحيح للبكتريا المستلمة.

وتشير النتائج الواردة في الجدول (30) الى انتقال صفة المقاومة للمضادات الحيوية من البكتريا الواهبة الى المستلمة بدلالة الصفات الوراثية لكل من البكتريا المقترنة Transconjugant Agrobacterium و Transconjugant Agrobacterium (*AtMcol*) (*C58C1*) المقاومة للمضادين الحيويين (Ch1, Tri)، علما ان تردد الإقتران لبكتريا *S. meliloti* مع *A. tumefaciens* (*AtMcol*) قد بلغ (1.8×10^{-2}) ولبكتريا *S. meliloti* مع *A. tumefaciens* (*C58C1*) بلغ (2.1×10^{-2}) . فضلاً عن اختزال عدد المستعمرات بعد التنقية من (19) الى (13) مستعمرة في حالة الإقتران بين *S. meliloti* و *A. tumefaciens* (*AtMcol*) من (14) الى (10) مستعمرة في حالة الإقتران بين *S. meliloti* و *A. tumefaciens* (*C58C1*).

الجدول (30) الاقتران البكتيري بين *S. meliloti* (خلايا واهبة) و *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (بوصفها خلايا مستلمة)

تردد الاقتران × 10 ⁻²	عدد المستعمرات المقترنة		الصفات الوراثية لمستعمرات <i>A. tumefaciens</i> المقترنة	اختيار الحساسية للمضادات الحيوية	
	بعد التنقية	قبل التنقية		البكتريا المستلمة (المحيطة)	البكتريا الواهبة
1.8	13	19	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol) Chl ^R Tri ^R	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol) Chl ^S Tri ^R (Curing)	<i>S. meliloti</i> Chl ^R Tri ^S
2.1	10	14	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1) Chl ^R Tri ^R	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1) Chl ^S Tri ^R (Curing)	<i>S. meliloti</i> Chl ^R Tri ^S

2.10.4 الإقتران بين *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (بوصفها خلايا واهبة) و *S. meliloti* (بوصفها خلايا مستلمة)

يوضح الجدول (31) نمط المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية في كل من البكتريا الواهبة والمستلمة (المحيطة) والناجمة من الاقتران. إذ يظهر من نتائج الجدول امتلاك بكتريا *A. tumefaciens* بنمطها البري والمحولة وراثياً صفة المقاومة للمضاد Rif وبتكريز (100) مايكروغرام/مل والحساسية للـ Cef بتكريز (30) مايكروغرام/مل، في حين كانت العزلة المستلمة *S. meliloti* (Rh1) حساسة للـ Rif ومقاومة للـ Cef بنفس التراكيز المذكورة انفاً. وبعد أن أجريت عملية الإقتران. ثم نقيت المستعمرات المقترنة من *S. meliloti* للتأكد من ثبوتية الصفات المكتسبة وذلك بعد ان حضرت منها مسحات وصبغت بصبغة كرام وفحصت بالمجهر الضوئي للتأكد من نقاوتها وعدم تلوثها وأظهرت نتائج الفحص أنها عسوية سالبة لصبغة كرام.

وتظهر النتائج ايضاً أن المستعمرات الناتجة من عملية الاقتران كانت قد امتلكت صفة المقاومة المنقولة من البكتريا الواهبة (الأكروبيكتريوم) البرية والمحولة وراثياً الى المستلمة *S. meliloti* (Rh1) (المحيطة) بدلالة الصفات الوراثية لكل من Transconjugation Sinorhizobium (1) و Sinorhizobium (2) المقاومة للمضادين الحيويين (Rif, Cef) وهذا يدل على انتقال البلازميد الحامل لصفة المقاومة للـ Rif من الأكروبيكتريوم الى الرايزوبيوم، وتشير النتائج الى ان تردد الاقتران قد بلغ (1.9 × 10⁻³) و

(1.6×10^{-3}) على التوالي. فضلاً عن اختزال عدد المستعمرات بعد التنقية من 15 الى 9 مستعمرات في حالة الاقتران بين *A. tumefaciens* و *S. meliloti* ومن 18 الى 11 مستعمرة في حالة الاقتران بين *A. tumefaciens* (C58C1) و *S. meliloti*.

الجدول (31) اقتران بكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (كخلايا واهبة) مع بكتريا *S. meliloti* (كخلايا مستلمة)

تردد الاقتران $10^{-3} \times$	عدد المستعمرات المقترنة		<i>S. meliloti</i> المقترنة	اختيار الحساسية للمضادات الحيوية	
	بعد التنقية	قبل التنقية		السلالة المستلمة	السلالة الواهبة
1.9	9	15	<i>S. meliloti</i> Rif ^R Cef ^R	<i>S. meliloti</i> Rif ^S Cef ^R (Curing)	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol) Cef ^S Rif ^R
1.6	11	18	<i>S. meliloti</i> Cef ^R Rif ^R	<i>S. meliloti</i> Rif ^S Cef ^R (Curing)	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1) Cef ^S Rif ^R

3.10.4 الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا المقترنة

لغرض دعم نجاح عمليات الاقتران والتي كشف عنها مسبقاً بالمضادات الحيوية بوصفها علائم وراثية بين الواهبة والمستلمة وثبات انتقالها في البكتريا الناتجة من الاقتران اجري عدد من الاختبارات الكيموحيوية التي تضي بدلائل اضافية على حدوث عمليات الاقتران بين الجنسين.

وبينت النتائج (الجدول 32) ان البكتريا الناتجة من الاقتران Transconjugation Sinorhizobium (1) و Sinorhizobium (2) اظهرت القدرة على الفلورة حين فحصها بجهاز UV light Transillumintor بعد نموها على وسط King medium الصلب. في حين أظهرت البكتريا المارة الذكر الناتجة من الإقتران نتيجة سالبة فيما يخص انتاجها للحامض من سكر الميليزيتوز وانتاج 3-كيتولاكتوز حين نموها على وسط أكار اللاكتوز لعدم تكون الحلقة الصفراء حول المستعمرات النامية على الوسط بعد غمر الاطباق بمحلول Benddicts reagent ، هذا فضلاً عن تعذر امكانية نموها على الاوساط الانتخابية (YEB, AMM) الخاصة بالأكروبيكتريوم واظهرت القدرة على تكوين الاورام التاجية على سيقان البادرات المحقونة على تكوين الاورام الشبيهة بالعقد على جذور بادرات الجت الملقحة بكليهما كل على حدة.

وعلى العكس من ذلك فقد اظهرت البكتريا الناتجة من الاقتران وهما Transconjugant و Transconjugant Agrobacterium (AtMcol) القدرة على انتاج 3- كيتولاكتوز وانتاج الحامض من سكر الميليزيتوز ونموها على وسطي (YEB, AMM)، الا انها لم تمتلك القابلية على الفلورة حين فحصها بجهاز UV light Transillumintor بعد نموها على وسط King medium الصلب وتكوينها للعقد الجذرية على جذور البادرات الملقحة بها كل على حدة.

ومن الجدير بالذكر افتقاد كل من *A. tumefaciens* و *S. meliloti* (المحيدة) على التعاقب القدرة على تكوين الاورام التاجية والعقد الجذرية على بادرات الجت الملقحة بكليهما.

الجدول (32) الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا المقترنة Tranconjugant bacteria

الاختبارات الكيموحيوية					البكتريا
النمو على وسط YEB	النمو على وسط AMM	انتاج الحامض من الميليزيتوز	انتاج 3- كيتولاكتوز	اختبار الفلورة	
-	-	-	-	+	<i>S. meliloti</i> (المقارنة)
-	-	-	-	+	<i>S. meliloti</i> (المحيدة)
+	+	+	+	-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (المقارنة)
+	+	+	+	-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (المحيدة)
-	-	-	-	+	Transconjugant Sinrhizobium(1)
-	-	-	-	+	Transconjugant Sinrhizobium(2)
+	+	+	+	-	Transconjugant Agrobacterium (AtMcol)
+	+	+	+	-	Transconjugant Agrobacterium (C58C1)

4.10.4 تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني في بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا *Sinorhizobium meliloti* و *Transconjugant Agrobacterium*

أبدت الشعيرات الجذرية لبادرات الجت *M. sativa* (الصفة العراقي) الملقحة بكل من البكتريا المتخصصة *S. meliloti* (المقارنة +) والمقترنة بنوعيهما *Transconjugant Agrobacterium* (C58C1) و *Agrobacterium* (AtMcol) ابدت تغيرات مختلفة متمثلة بتحويلها من الشكل المستقيم الى الشكل المشوه على التعاقب، واستجابات البادرات الملقحة لتكوين العقد بمعدل (3،2،3 عقدة / نبات) على التعاقب التي تباينت في اشكالها ما بين (كروية ، بيضوية متفرعة ،كبدية) وتكوينها على الجذور الجانبية في حالة البادرات الملقحة ببكتريا *Transconjugant Agrobacterium*(AtMcol) وبنسبة تكوين بلغت 40% وبمعدل 3 عقدة /نبات، في حين اخذت الشكل (الكروي او البيضوي) ووقعت على الجذور الجانبية في حالة *Transconjugant Agrobacterium* (C58C1) وبنسبة تكوين بلغت 50% وبمعدل 2عقدة/ نبات بالمقارنة مع عينة المقارنة الموجبة *S. meliloti* التي بلغت نسبة التكوين فيها 72% وبمعدل 3عقدة/نبات ، وانعكس ذلك على رفع المحتوى البروتيني في المجموع الخضري للبادرات المكونة للعقد الى (4.5، 4.1، 3.8) على التعاقب، مما يدل على انتقال صفة المقاومة للـCh1 او بعبارة أخرى انتقال بلازميدات التعايش Sym-plasmid من *S. meliloti* الى الأروبكتريوم بطريقة الاقتران، وعلى العكس من ذلك لم تبد البكتريا *S. meliloti* (المحيدة) اي قابلية على تكوين العقد وكذلك الحال مع البكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) ، *tumefaciens* (AtMcol) قبل الاقتران (الجدول 33).

وأظهرت نتائج اعادة عزل بكتريا *A. tumefaciens* (المقترنة) بنمطها البري والمحولة وراثياً من العقد المتكونة على جذور بادرات الجت، وتلقيح حجم (20) مل الوسطين السائلين (YEB, AMM) ومجموعتين من أطباق بتري قطره (9.0) سم يحتوي كل منهما على حدود (20) مل من الوسطين (YEB, AMM) الصلبة حصول حالة نمو البكتريا في هذه الأوساط وتكون مستعمراتها.

الجدول (33) قدرة البكتريا المقتترنة *Transconjugant Agrobacterium* على تكوين العقد الجذرية على جذور بادرات الجت *M. sativa*

المحتوى البروتيني (ملغم/غم)	موقع العقد على الجذر	شكل العقد	النباتات المكونة للعقد (%)	معدل عدد العقد/نبات	عدد البادرات المكونة للعقد	البكتريا
4.5	الرئيسي والجانبى	بيضوية	72	3	14	<i>S. meliloti</i> (المقارنة الموجبة)
—	—	—	0.0	0.0	0.0	<i>S. meliloti</i> (المحيدة)
—	—	—	0.0	0.0	0.0	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1) (المقارنة السالبة)
4.1	الجانبى	(كروية، بيضوية، متفرعة كبدية)	40	2	10	Transconjugant Agrobacterium (AtMcol)
—	—	—	0.0	0.0	0.0	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol) (المقارنة السالبة)
3.8	الجانبى	(بيضوية، كروية)	50	3	8	Transconjugant Agrobacterium (C58C1)

معدل 20 بادرة/ معاملة

5.10.4 تكوين العقد الجذرية على بادرات الجت الملقحة بالبكتريا المقتترنة والمعاد عزلها من العقد

اشارت نتائج الجدول (34) أن جذور بادرات الجت بعمر 48 ساعة الملقحة بكل من البكتريا المقتترنة والمعاد عزلها من العقد الجذرية للبادرات الملقحة مسبقاً بالبكتريا *Transconjugant Agrobacterium* (AtMcol) و *Transconjugant Agrobacterium* (C58C1) كل على حدة نجحت في إعادة تكوين العقد الجذرية على جذور هذه البادرات مما يؤكد ثبات صفة تكوين العقد في البكتريا الناتجة من الاقتران *Transconjugant Agrobacterium*.

الجدول (34) قدرة البكتريا المقترنة *Transconjugant Agrobacterium* المعاد عزلها من العقد على تكوين العقد الجذرية على بادرات الجت *M. sativa*

المحتوى البروتيني (ملغم/غم)	موقع العقد	شكل العقد	النباتات المكونة للعقد (%)	معدل عدد العقد/نبات	عدد البادرات المكونة للعقد	البكتريا
4.5	الجذر الرئيسي والجانبى	بيضوية	72	3	14	<i>S. meliloti</i> (المقارنة الموجبة)
3.7	الجذر الجانبى	بيضوية	25	1	5	Transconjugant Agrobacterium (AtMcol)
3.6	الجذر الجانبى	كروية	35	1	7	Transconjugant Agrobacterium (C58C1)

معدل 20 بادرة/معاملة

6.10.4 تكوين التراكيب الشبيهة بالأورام *Tumor-like structures* على جذور بادرات الجت بواسطة *Transconjugant Sinorhizobium*

أكدت نتائج تلقیح بادرات الجت بغمرها في لقاح بكتريا *Transconjugant Sinorhizobium* (1) الناتجة من اقتران *A. tumefaciens*(AtMcol) مع *S. meliloti* وكذلك البكتريا (2) *Transconjugant Sinorhizobium* الناتجة من اقتران *A. tumefaciens*(C58C1) مع *S. meliloti* عدم حصول حالة التشوه للشعيرات الجذرية لبادرات الجت الملقحة بهذه البكتريا، وعدم تكون العقد الا ان النتائج اظهرت تكوين عدد من الأورام الشبيهة بالعقد لم تتكون على جذور البادرات الملقحة بالـ *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (عينة المقارنة الموجبة) ولا على جذور البادرات الملقحة *S. meliloti* (عينة المقارنة السالبة) وبلغت نسبة تكوينها 60% في البادرات الملقحة بـ *Transconjugant Sinorhizobium* (1) و 70% في البادرات الملقحة ببكتريا *Transconjugant Sinorhizobium* (2) الجدول (35) ويظهر في الشكل (16) ان هذه الأورام قد ظهرت على

الجزور الجانبية وعدد منها امتد الى الجذر الرئيس لهذه البادرات وتتنوع احجامها واشكالها ما بين الكبيرة الى الصغيرة (أقل من 1 مل) واشكالها ما بين البيضوي أو الكروي أو أحياناً غير منتظمة الشكل (16) واختلفت من حيث الوانها ما بين الكريمي الى اللون الداكن. و أثرت هذه الأورام سلباً على نمو البادرة من حيث عدد الأفرع الخضرية (1-2) فرع وتقزم البادرة المصابة ومجموعها الجذري على الرغم من حيويتها الواضحة من حيث شكل اوراقها ولونها.

الجدول (35) تكوين التراكيب الشبيهة بالأورام Tumor-like structures على جذور بادرات

الجت الملقحة ببكتريا *Transconjugant Sinorhizobium*

المحتوى البروتيني (ملغم/غم)	معدل طول المجموع الخضري (سم)	عدد الأفرع الخضرية	موقعها	التراكيب الشبيهة بالأورام		البكتريا
				معدل تكوينها (%)	عدد البادرات المكونة لها	
1.95	0.0	0.0	—	0.0	0	<i>A. tumefaciens (AtMcol)</i> (المقارنة الموجبة)
4.5	—	—	—	0.0	0	<i>S. meliloti</i> (المقارنة السالبة)
2.9	6	1	الجذور الجانبية	60	12	<i>Transconjugant Sinorhizobium (1)</i>
2.1	—	—	—	0.0	0	<i>A. tumefaciens (C58C1)</i> (المقارنة الموجبة)
3.1	5	2	الجذور الجانبية	70	14	<i>Transconjugant Sinorhizobium (2)</i>

20 بادرة لكل معاملة

- لا يوجد استجابة

الشكل (16) العقد الجذرية والتراكيب الشبيهة بالاورام المتكونة على جذور بادرات الجت الملقحة بالبكتريا المقترنة.

A. العقد الجذرية المتكونة على الجذر الرئيس لبادرة الملقحة ببكتريا Transconjugant Agrobacterium (AtMco1)

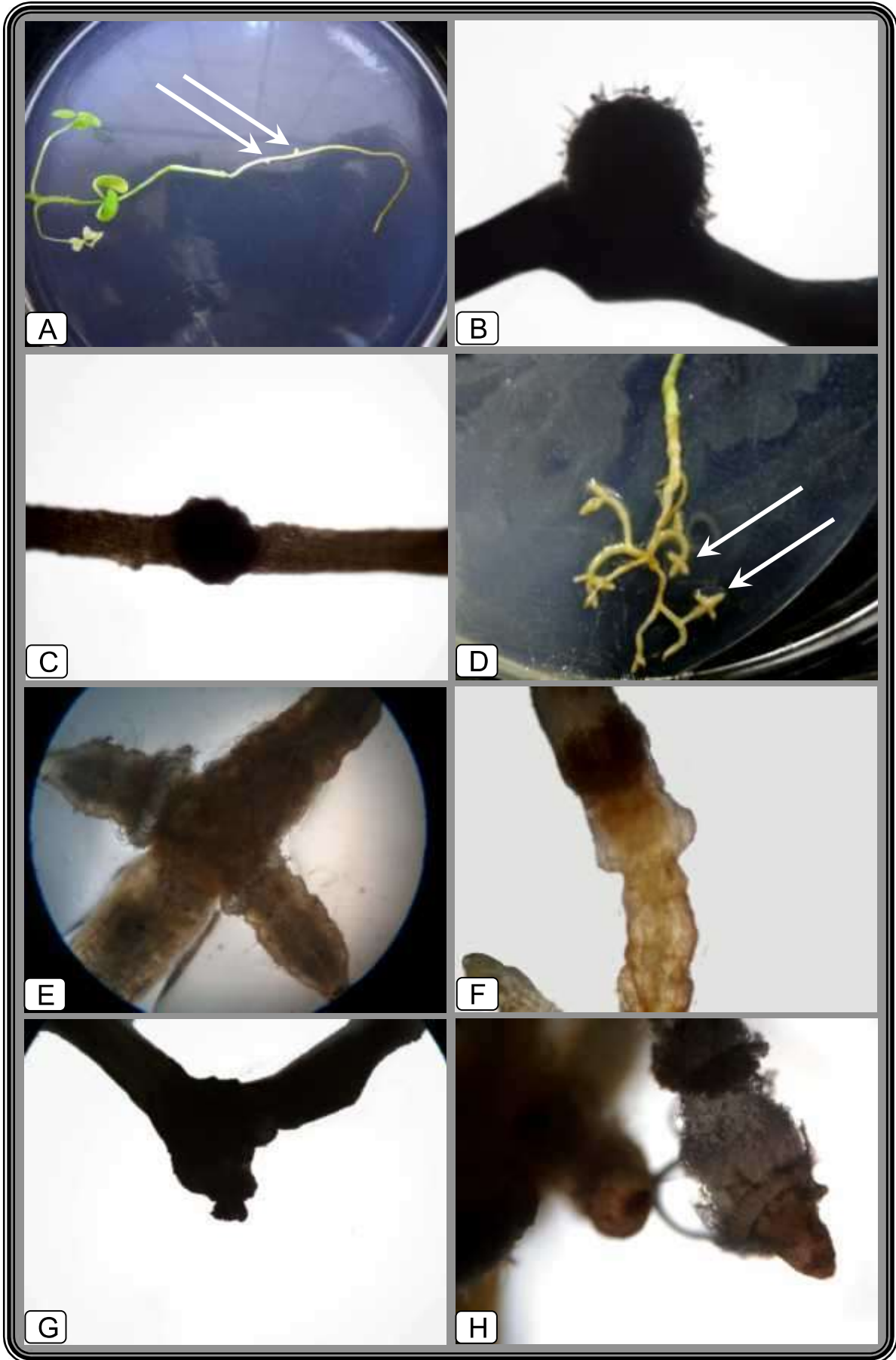
B. العقد الجذرية من A عند القوة (40×)

C. العقد الجذرية المتكونة على الجذر الجانبي لبادرة الجت الملقحة ببكتريا Transconjugant Agrobacterium (C58C1) عند القوة (40x)

D. التراكيب الشبيهة بالاورام (الجزء المؤشر) المتكونة على جذور بادرة الجت الملقحة ببكتريا Transconjugant Sinorhizobium(1)

F-E. التراكيب الشبيهة بالاورام من (D) عند القوة (40x)

G-H. التراكيب الشبيهة بالاورام المتكونة على جذور بادرة الجت الملقحة ببكتريا Transconjugant Sinorhizobium(2) عند القوة (40x)

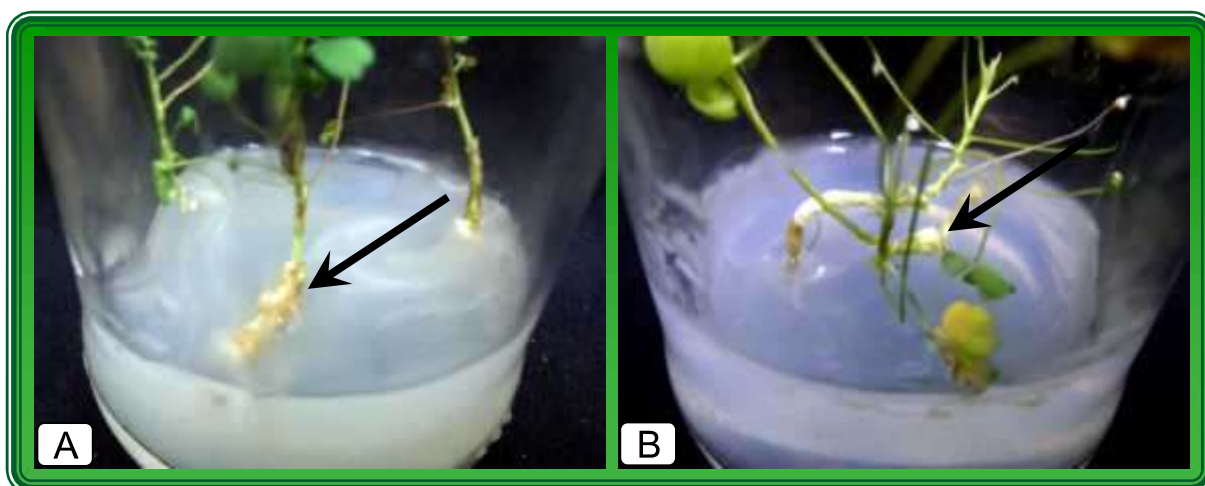


7.10.4 التلقيح المباشر لبادرات الجت ببيكتريا *Transconjugant Sinorhizobium*

كشفت النتائج حين حقن البادرات المقطوعة المجموع الجذري في موقعين مختلفين في منطقة الساق تحت الفلقية بلقاح البكتريا الناتجة من الإقتران التي شملت كلاً من *Transconjugant Sinorhizobium (1)* و *Transconjugant Sinorhizobium (2)* ذات الكثافة الضوئية (0.75) كشفت ظهور استجابة واضحة في تكوين عدد من الأورام التاجية بدأت بعد 16 يوم من الحقن بتكوين انتفاخات في مواقع الحقن تطورت الى عقدة تاجية كاملة بنسبة بلغت 32 % من البادرات المحقونة بالبكتريا في الحالة الأولى بالمقارنة مع البادرات المحقونة بالبكتريا *A. tumefaciens (AtMcol)* (عينة المقارنة الموجبة) و بلغت نسبة تكوين الأورام فيها (72)% بعد (14) يوماً من الحقن، في حين لم تظهر البادرات المحقونة ببيكتريا *S. meliloti* (عينة المقارنة السالبة) اي استجابة لتكوين الأورام التاجية عليها، في حين بدأ التحفيز في تكوين الانتفاخات الممهدة لتكوين العقد التاجية في البادرات المحقونة بالبكتريا المقترنة *Transconjugant Sinorhizobium (2)* بعد 19 يوماً من حقن البادرات وبنسبة بلغت 25% بالمقارنة مع البادرات المحقونة بالبكتريا *A. tumefaciens (C58C1)* (عينة المقارنة الموجبة) التي اظهرت فيها نسبة (72)% في تحفيز لتكوين الأورام التاجية في مواقع الحقن على السيقان تحت الفلقية بعد (13) يوماً من الحقن (الجدول 36)، وبشكل عام كان لظهور الانتفاخات في مواقع الحقن أولى الدلائل لنجاح عمليات التحول الوراثي لهذه البادرات والتي نتج عنها تكوين الأورام التاجية التي ظهرت خشنة المظهر ذات لون أخضر أو أبيض مائل الى البني في القسم الآخر (الشكل 17) وتطورت الى تكوين العقدة التاجية الكاملة في مناطق التاج Crown بعد (10-15) يوماً من تحفيز ظهورها. في حين لم تظهر بكتريا *A. tumefaciens* المحيدة أي قدرة على تكوين الأورام على السيقان تحت الفلقية.

الجدول (36) قدرة البكتيريا المقترنة *Transconjugant Sinorhizobium* على تكوين الأورام التاجية على سيقان بادرات الجت *M.sativa*

مدة بدء تكوين الأورام التاجية (يوم)	تكوين الأورام التاجية (%)	عدد البادرات الملقحة/ المستجابة	البكتيريا
0.0	0.0	0/15	<i>S. meliloti</i> (المقارنة)
14	72	17/24	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol) (المقارنة الموجبة)
0.0	0.0	0/25	<i>A. tumefaciens</i> (المحيدة)
16	32	8/25	Transconjugant Sinorhizobium (1)
13	70	21/30	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1) ⁺
0.0	0.0	0.0/30	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1) (المحيدة)
19	25	5/20	Transconjugant Sinorhizobium (2)



الشكل (17) الاورام التاجية الناشئة على بادرات الجت *M. Sativa* بالحقن المباشر ببكتريا *Transconjugant Sinorhizobium*.

- A. الاورام التاجية (الجزء المؤشر) على البادرات المحقونة بـ *Transconjugant Sinorhizobium* (1) بكتريا
- B. الاورام التاجية (الجزء المؤشر) على البادرات المحقونة بـ *Transconjugant Sinorhizobium* (2) بكتريا

11.4 الدلائل الجزيئية لحدوث الانتقال الأفقي للجينات بين *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثيا و *S.meliloti*

1.11.4 تقدير قيم تراكيز الـ DNA البلازميدي ونقاوته في بكتريا *S. meliloti* و *A. tumefaciens* البرية والمحولة والنااتجة من الاقتران

قيست تراكيز الـ DNA البلازميدي المعزول ونقاوته من العزلات البكتيرية المقترنة والنااتجة من الاقتران ومقارنتها مع تراكيز الـ DNA البلازميدي للعزلات المستلمة ، ومن الجدول (37) يتبين أن هناك زيادة ملحوظة في تراكيز الـ DNA البلازميدي المعزول من البكتريا (المستلمة) التي قد شفيت قبل اجراء عملية الاقتران مما يشير الى اكتساب الاخيرة للاحماس النووية من البكتريا الواهبة في عملية الاقتران مما يؤكد ويدعم نجاح الاقتران البكتيري. وقد تراوح معدل مدى الزيادة في قيم تراكيز الـ DNA البلازميدي في البكتريا المقترنة الناتجة من عمليات الاقتران المنجزة في هذه الدراسة من 44.5 $\mu\text{g/ml}$ الى 62 $\mu\text{g/ml}$. علماً أن اعلى معدل لقيمة تركيز الـ DNA البلازميدي كان من البكتريا المقترنة الناتجة من عملية التزاوج ما بين بكتريا الرايزوبيوم المحيدة مع بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) في حين كان أدنى معدل لقيمة التركيز للـ DNA البلازميدي المعزولة من البكتريا المقترنة الناتجة من عملية التزاوج ما بين بكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) المحيدة مع بكتريا الرايزوبيوم *S. meliloti* المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت العراقي.

في حين بلغ أعلى معدل لتركيز الـ DNA البلازميدي للبكتريا قبل اجراء عمليات التحديد والاقتران وكان قد سجل في بكتريا *S. meliloti* الذي بلغ 120 $\mu\text{g/ml}$ وادناه في بكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) والذي بلغ 61.1 $\mu\text{g/ml}$.

الجدول (37) قيم تراكيز الـ DNA البلازميدي المعزول من بكتريا *S. meliloti* و *A. tumefaciens* البرية والمحولة والناجمة من الاقتران

التركيز (مايكروغرام/مل)	A1/A2	A1	A1	العينة
113	1.173	0.096	0.113	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)
50.8	1.479	0.344	0.508	<i>A. tumefaciens</i> المحيدة (C58C1)
97	1.575	0.616	0.970	Transconjugant agrobactrium (C58C1)
61.1	1.232	0.496	0.611	<i>A. tumefaciens</i> (AtMc01)
29.9	1.462	0.204	0.299	<i>A. tumefaciens</i> المحيدة (AtMc01)
74.4	1.455	0.511	0.744	Transconjugant agrobactrium(AtMc01)
120	1.119	0.107	0.120	<i>S. meliloti</i>
78	1.213	0.064	0.078	<i>S. meliloti</i> المحيدة
131	1.076	0.130	0.140	Transconjugant sinorhizobum (1)
140	1.149	0.114	0.131	Transconjugant sinorhizobum (2)

2.11.4 توصيف محتوى الـ DNA البلازميدي لبكتريا *S. meliloti* و *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً والمقترنة بالترحيل على هلام الاكاروز

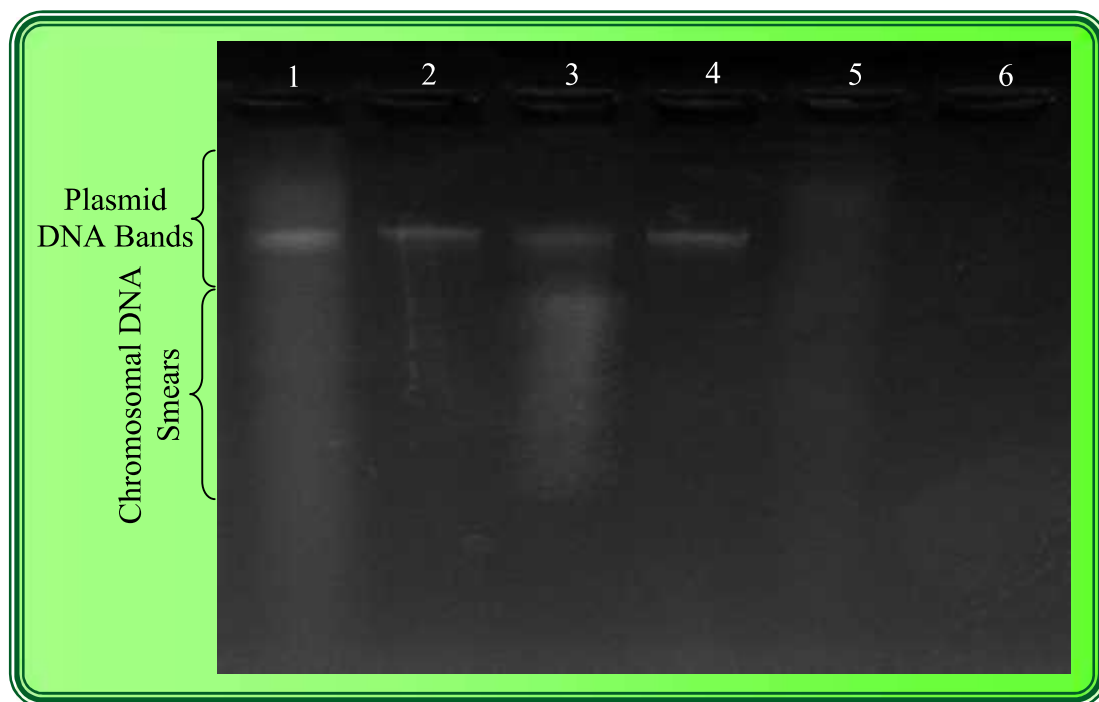
بعد استخلاص محتوى الـ DNA البلازميدي من بكتريا *S. meliloti* و *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً والمقترنة والمحيدة بالاكردين البرتقالي وحسب ما ورد في الفقرة (1.1.9.3) من مواد وطرائق العمل. ولغرض دعم نتائج التحديد والاقتران واثبات انتقال الـ DNA البلازميدي من العزلات البكتيرية الواهبة الى البكتريا المستلمة بعد اجراء تحييدها من بلازميدها. تم توصيف محتوى الـ DNA البلازميدي لهذه العزلات بتقانة الترحيل على هلام الاكاروز (0.8) % .

ويتبين من الشكل (18) ظهور محتوى الـ DNA البلازميدي بشكل حزم منفصلة خارجة من الحفر باتجاه القطب الموجب في الاعمدة (3 ، 4) والمتمثلة بحزم الـ DNA ببكتريا

A. tumefaciens المحولة والبرية على التوالي وتوضح الاعمدة (1 ، 2) حزم الـ DNA البلازميدي للعزلات المقترنة (1) *Sinorhizobium* Transconjugant و *Transconjugant* (2) *Sinorhizobium* على التوالي وخطو العزلة *S. meliloti* المحيدة في العمود (6) من البلازميد (بفعل المعاملة بالاكريدين البرتقالي)، إذ يعطي هذا الشكل دليلاً واضحاً على حصول عملية الاقتران بين العزلات البكتيرية بانتقال Ti بلازميد لكل من العزلتين البرية والقياسية لـ *A. tumefaciens* الى البكتريا المستلمة بدلالة الاحجام المتساوية للـ DNA في العزلات المقترنة مع حزمة DNA البلازميدي للعزلات الواهبة والذي يمثل الميكا بلازميد DNA و يقدر بـ 200 kbp بدلالة اكتساب العزلات المقترنة المار ذكرها محتوى الـ DNA البلازميدي للبكتريا الواهبة مما اكسبها صفة المقاومة للمضادات الحيوية والقابلية على تكوين الاورام التاجية على السيقان تحت الفلقية والتراكيب الشبيهة بالاورام على جذور البادرات الملقحة فيها .

وأظهرت الاشكال (19,20) انفصال حزم من الـ DNA البلازميدي في اعمدة الترحيل الكهربائي للمحتوى البلازميدي للعزلتين المقترنتين *Transconjugant Agrobacterium* (AtMco1) و *Transconjugant Agrobacterium* (C58C1) وخطو العزلتين للاكروبيكتريم بنمطيهما البري والمحول وراثياً من البلازميد حين المعاملة بالاكريدين البرتقالي، ويظهر من الاشكال المارة حزم متساوية الحجم الجزيئي لبلازميد pSym التكافلي لبكتريا *S. meliloti* الواهبة بدلالة اكتساب البكتريا المستلمة محتوى الـ DNA البلازميدي للبكتريا الواهبة واكسابها صفة المقاومة للمضادات الحيوية والقابلية على تكوين العقد الجذرية على جذور البادرات الملقحة وربما تمثل هذه الحزم التي انفصلت عند الترحيل على هلام الاكاروز البلازميدات ذات الحجم الكبير التي تدعى الميكابلازميد والتي انتقلت من العزلات الواهبة واستوطنت في العزلات المستلمة (في حالتها الاقتران) وتضاعفت داخل الخلية المستلمة وعبرت عن نفسها باعطائها صفة المقاومة للمضادات الحيوية فضلاً عن الصفات الامراضية المتمثلة باكساب الخلية المستلمة القدرة على تكوين العقد الجذرية او الاورام على البادرات الملقحة فيها وبشكل متعاكس.

في حين يظهر الشكل (21) محتوى الـ DNA البلازميدي لعزلات *Sinorhizobium meliloti* الاربعة ، اذ يبين الشكل المار الذكر امتلاك العزلتين (Rh4, Rh1) على نسخة واحدة من البلازميد وامتلاك العزلتين (Rh3, Rh2) على حزمتين او نسختين من البلازميدات التعايشية متساوية الاحجام .



الشكل (18) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% للبكتريا الناتجة من الاقتران ما بين *Agrobacterium tumefaciens* البرية والمحوّلة وراثياً و *Sinorhizobium meliloti*

العمود (1): المحتوى البلازميدي لبكتريا (1) Transconjugant sinorhizobium

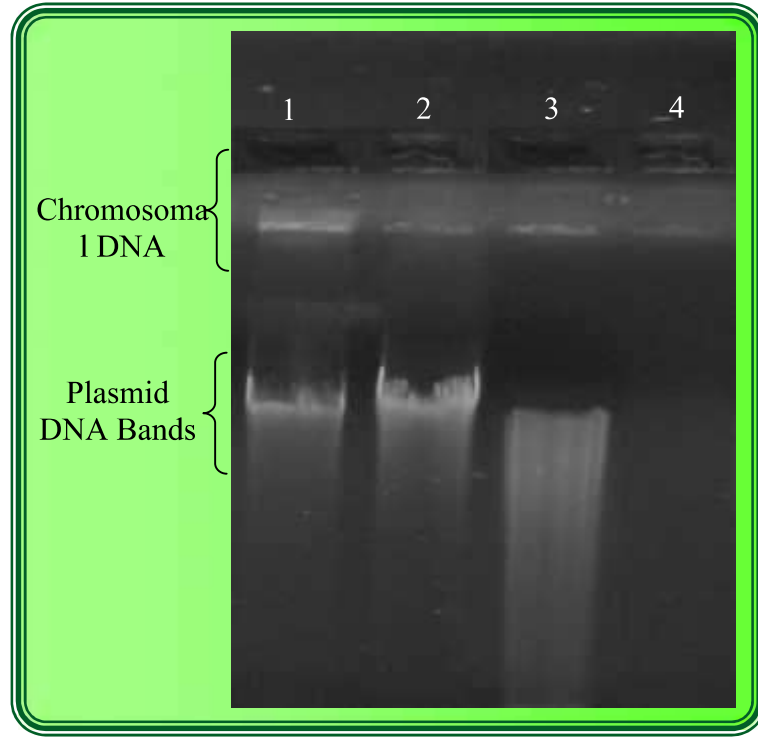
العمود (2): المحتوى البلازميدي لبكتريا (2) Transconjugant sinorhizobium

العمود (3): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1)

العمود (4): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (AtMco1)

العمود (5): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti*

العمود (6): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* (المحيّدة)



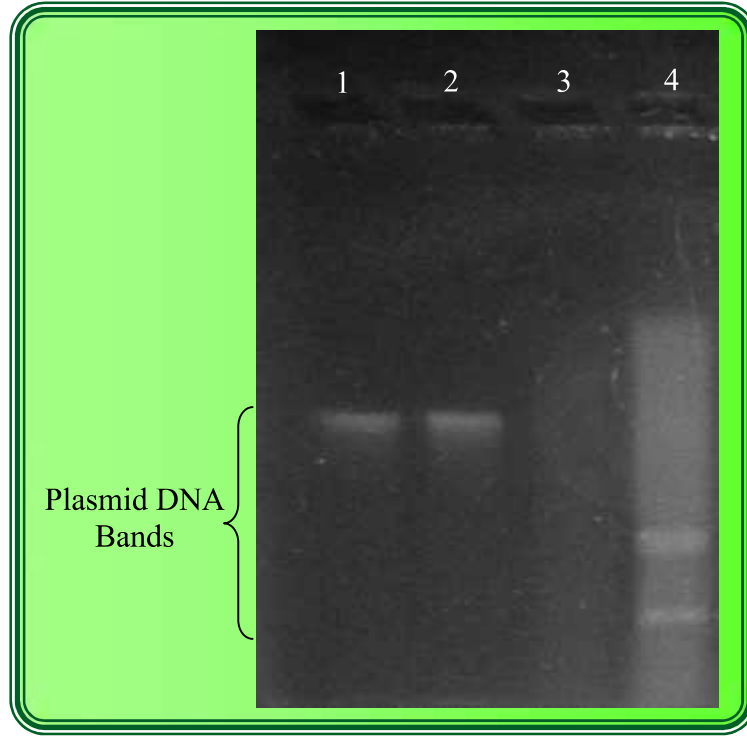
الشكل (19) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% للبكتريا الناتجة من الاقتران ما بين *Sinorhizobium meliloti* و *Agrobacterium tumefaciens* البرية

العمود (1): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti*

العمود (2): المحتوى البلازميدي لبكتريا Transconjugant *Agrobacterium* (AtMco1)

العمود (3): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (AtMco1)

العمود (4): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (المحيطة) (AtMco1)



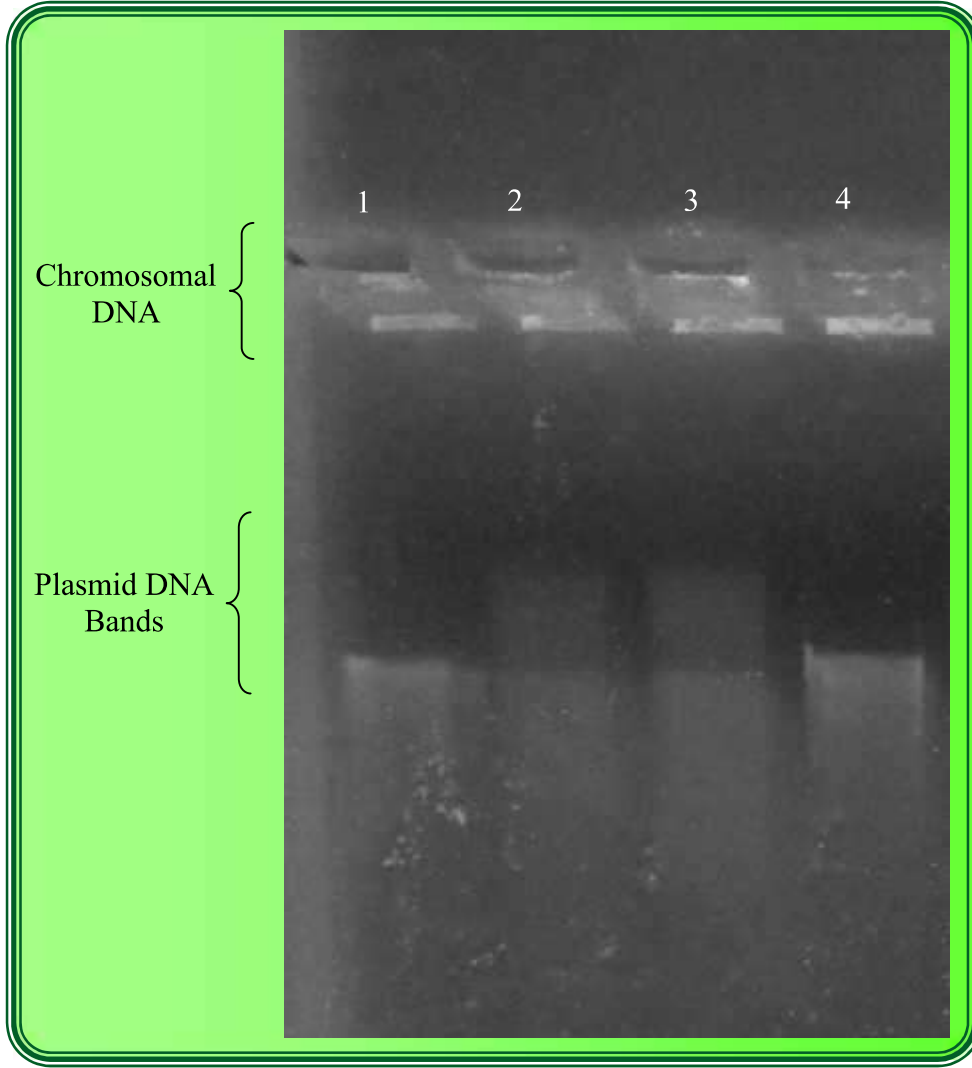
الشكل (20) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% للبكتريا الناتجة من الاقتران ما بين *Sinorhizobium meliloti* و *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) المحولة وراثيا.

العمود (1): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti*

العمود (2): المحتوى البلازميدي لبكتريا Transconjugant *Agrobacterium* (C58C1)

العمود (3): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) المحيدة

العمود (4): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1)



الشكل (21) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% لعزلات بكتريا *Sinorhizobium meliloti* الاربع.

العمود (1): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* (Rh_1)

العمود (2): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* (Rh_2)

العمود (3): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* (Rh_3)

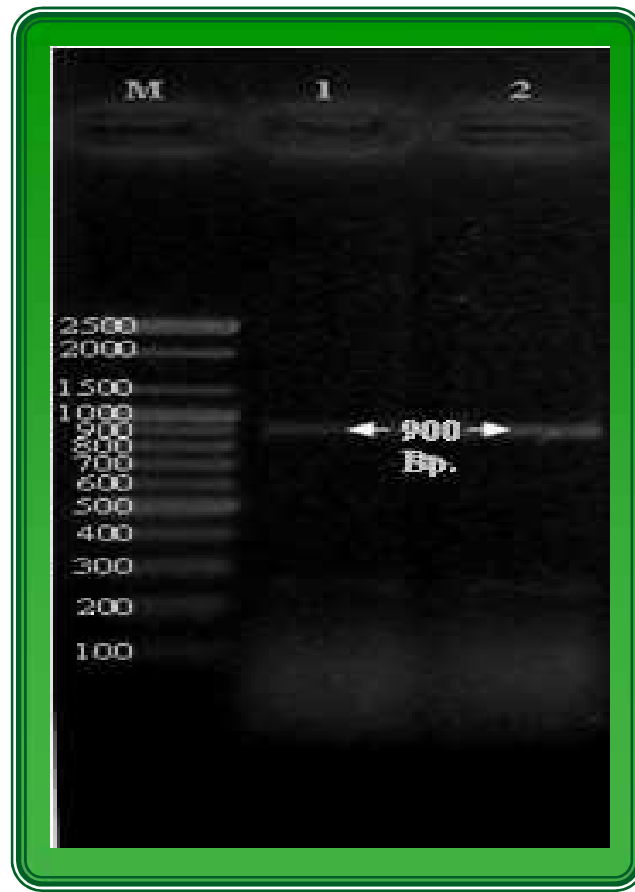
العمود (4): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* (Rh_4)

3.11.4 التشخيص عند المستوى الجزيئي لعزلة الاكروبيكتريوم باستخدام بتقانة Specific- PCR

تم التحري عن وجود قطعة الحمض النووي المنقول (Transferred-DNA (T-DNA) من تحديد وجود الجين *rol-B* باعتماد البادئ الخاص بذلك (CPR, CPF) بتقانة – Gradient PCR، إذ اظهرت نتائج تضخيم الـ DNA البلازميدي للعينات البكتيرية *A.tumefaciens* (AtMco1) و *A.tumefaciens* (C58C1) المشخصة سابقاً عن تولد حزمًا منفردة واضحة عند الحجم الجزيئي 900 زوج قاعدي في اثناء ترحيل نواتج التضخيم ضمن هلام الاكاروز المعرض لمصدر الاشعة فوق البنفسجية ، من التحديد الشبه الكمي للحزم وفق برنامج CS Analyzer، وجاءت هذه النتائج مطابقة مع ما تبين من معلومات (900 زوج قاعدي) تخص تصميم البادئ المذكورة انفاً ضمن الموقع الالكتروني للمركز العالمي لمعلومات التقنيات الاحيائية (National Center for Bioinformatil Information (NCBI)، وكما في الشكل (22) والجدول (38).

4.11.4 التشخيص عند المستوى الجزيئي للعزلات المقترنة Transconjugant Sinorhizobium بتقانة Specific- PCR

بعد استخلاص الـ DNA البلازميدي من بكتريا *A.tumefaciens* (البرية والمحولة) و Transconjugant Sinorhizobium المقترنة و *S. meliloti* حسب ما ورد في الفقرة (1,2) من مواد العمل وطرائقه ، تم التحري عن انتقال بلازميد Ti لكل من البكتريا البرية والمحولة وراثياً بوصفها خلايا واهبة الى بكتريا *S. meliloti* بوصفها خلايا مستلمة (خلال عملية الاقتران) وذلك بالتحري جزيئياً عن وجود الجين *rol-B* باعتماد البادئ الخاص بذلك، إذ اظهرت نتائج الترحيل لنواتج التضخيم للـ DNA البلازميدي للعينات البكتريا الناتجة من الاقتران Transconjugant Sinorhizobium (1,2) على هلام الاكاروز تولد حزمًا منفردة عند الحجم الجزيئي (900 زوج قاعدي) وجاءت هذه النتائج مطابقة مع ما جاء من معلومات (900 زوج قاعدي) تخص تصميم البادئ المذكورة انفاً ، وتطابق الوزن الجزيئي لهذه الحزمة مع الوزن الجزيئي لحزم عينات البكتريا الواهبة *A.tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً (الشكل 23) والجدول (38) وغياب انفصال مثل هذه الحزمة في الـ DNA البلازميدي المضخم لعينة المقارنة السالبة *S. meliloti* (المستلمة) وجاءت هذه النتائج لتؤكد بشكل قاطع انتقال بلازميدات Ti الخبيثة من بكتريا *A.tumefaciens* التي تمتاز بحجمها الكبير الى البكتريا المستلمة *S. meliloti* (المحيطة) بدلالة اكتساب البكتريا المقترنة القدرة على احداث الاورام التاجية على السيقان وتكوين التراكيب الشبيهة بالاورام بالعقد على جذور البادرات الملقحة فيها.

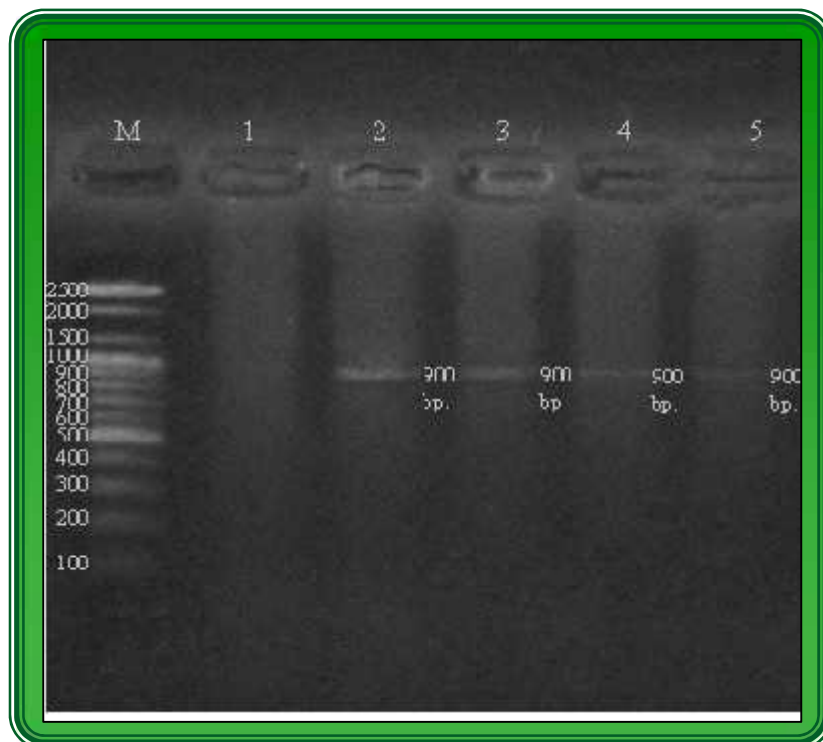


الشكل (22): وجود الجين *rol-B* من عينة الـ DNA البلازميدي المضخمة المعزول من *A. tumefaciens* البرية والمحوّلة وراثيا بالترجيل الكهربائي من 1.5% من هلام الاكاروز.

المسار (M): الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)

المسار (1): يمثل نتيجة موجبة للـ DNA البلازميدي المضخم والمعزول من بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) (عينة المقارنة)

المسار (2): يمثل نتيجة موجبة للـ DNA البلازميدي المضخم والمعزول من بكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) البرية



الشكل (23) وجود الجين *rol-B* في عينة الـ DNA البلازميدي المضخمة والمعزولة من Transconjugant *Sinorhizobium* (1,2) بالترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز 1.5%.

المسار (M): الدليل الحجمي (100 زوج قاعدي)

المسار (1): يمثل نتيجة موجبة للـ DNA البلازميدي المضخم والمعزول من بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) (عينة المقارنة الموجبة)

المسار (2): يمثل نتيجة موجبة للـ DNA البلازميدي المضخم والمعزول من بكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) (عينة المقارنة الموجبة)

المسار (3): من بكتريا Transconjugant *Sinorhizobium* (1)

المسار (4): من بكتريا Transconjugant *Sinorhizobium* (2)

المسار (5): يمثل نتيجة سالبة للـ DNA البلازميدي المضخم والمعزول من بكتريا *S. meliloti* (عينة المقارنة السالبة).

الجدول (38): القراءة الرقمية لنواتج تضخيم الـ DNA البلازميدي لعينات بكتريا *A. tumefaciens* البرية, والمحولة وراثيا و *Transconjugant sinorhizobium* الناتجة من الاقتران باستخدام الباديء (CPF, CPR) وفق برنامج CS Analyzer.3.1

عينات الـ DNA البلازميدي المضخمة					الاوزان الجزئية للدليل الحجمي
<i>S. meliloti</i>	Transconjugant Sinorhizobium 2	Transconjugant Sinorhizobium 1	<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)	
-	-	-	-	-	2500
-	-	-	-	-	2000
-	-	-	-	-	1500
-	-	-	-	-	1000
-	+	+	+	+	900
-	-	-	-	-	800
-	-	-	-	-	700
-	-	-	-	-	600
-	-	-	-	-	500
-	-	-	-	-	400
-	-	-	-	-	300
-	-	-	-	-	200
-	-	-	-	-	100

رابعاً: التحول الوراثي لنباتات الجت *M. sativa*
بوساطة بكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً

12.4 تضمين جينات T-DNA من بكتريا *A. tumefaciens* البرية و المحولة وراثياً في
انسجة الجت *Medicago sativa* وتكوين النباتات من مزارع الأورام التاجية وكالسها

1.12.4 احتفاظ البكتريا بعلائمها الوراثية

أظهرت نتائج الاختبارات الدورية احتفاظ بكتريا (*AtMcol*) *A. tumefaciens* و *A. tumefaciens* (C58C1) بعلائمها الوراثية وذلك بنموها على وسطي YEB, AMM, والمدعمة الريفامبيسين بتركيز (250 و 100) مايكروغرام/مل والجينتامايسين بتركيز (40) مايكروغرام/مل على التوالي.

2.12.4 انتخاب العمر المناسب لحقن بادرات الجت

أظهرت نتائج تلقح بادرات الجت *M. sativa* بأعمارها المختلفة (1-6) اسابيع ببكتريا *A. tumefaciens* المحولة وراثياً وبكثافة ضوئية بلغت 1.5 استجابات متباينة في تكوينها للأورام التاجية. وتوقفت البادرات التي بعمر اربعة أسابيع على نظيراتها في الاعمار الباقية في تسجيل أعلى نسبة (53.3%) لتكوين الأورام التاجية تلتها البادرات بعمر خمسة أسابيع (40%) الجدول (39)، مما يدل على مدى استجابة هذا النبات للاصابة بهذه البكتريا لذلك اعتمدت البادرات التي بعمر اربعة اسابيع عمراً مناسباً لحقن البادرات لغرض تكوين الاورام التاجية عليها.

الجدول (39) انتخاب العمر المناسب لحقن البادرات بلقاح بكتريا (*A. tumefaciens* (C58C1)

اعداد البادرات			الملقحة	عمر البادرات (الاسبوع)
البادرات الميتة	تكوين الأورام التاجية (%)	المكونة للأورام التاجية		
19	5	1	20	الاسبوع الأول
22	12	3	25	الاسبوع الثاني
18	28	7	25	الاسبوع الثالث
14	53.3	16	30	الاسبوع الرابع
18	40	12	30	الاسبوع الخامس
26	13.3	4	30	الاسبوع السادس

3.12.4 انتخاب الكثافة الضوئية للقاح البكتيري لاستحثاث الاورام التاجية على بادرات الجت *M. sativa* بالحقن المباشر ببكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً

عبرت نباتات الجت *M. sativa* عن استجابتها للتلقيح ببكتريا *A. tumefaciens* ((AtMcol)) بدلالة تكوين الاورام التاجية عليها، وأظهرت النتائج تباين استجابتها، حين تلقيحها بكثافات متباينة من اللقاح البكتيري (الجدول 40)، إذ تفوقت البادرات الملقحة باللقاح ذي الكثافة (OD 1.0) والآخر ذو الكثافة (OD 0.75) لبكتريا (AtMcol) *A. tumefaciens* في استجابتها لتكوين الاورام التاجية بنسبة (54.1 و 50%) على التوالي، في حين ادى استعمال اللقاح بالكثافة OD 1.5 الى انخفاض معدل تكوين الاورام الى 35.7% من ناحية أخرى أظهرت البادرات قابلية كبيرة على تكوين الاورام عليها بنسبة تكوين 53.3% حين حقنها بلقاح *A. tumefaciens* (C58C1) OD (1.5) بعد 13 يوماً من الحقن، تلتها الكثافة الضوئية OD 1.0 (47.6)%. وتكونت هذه الاورام عند مواقع الحقن باللقاح على السيقان تحت الفلجية، وكانت أولى دلائل نجاح عمليات الحقن بكثافات متباينة من اللقاح وغرسها قائمةً في وسط WP بنصف قوته التركيبية، وهو تحمل هذه البادرات واحتفاظها بحيويتها، وظهرت انتفاخات على مناطق الحقن بعد (13-19) يوماً وبدت هذه الاورام خشنة المظهر ذات لون أخضر أو ابيض مائل الى البني في القسم الاخر (الشكل 24) في بادرات الجت الملقحة باللقاح ذو الكثافة الضوئية (1.0)، بعد مرور 35 يوماً من تلقيحها ومن جانب اخر تراوح قطر هذه الاورام ما بين (0.2 - 0.6) ملم في البادرات الملقحة بكل من البكتريا المعزولة والمحولة وراثياً على التعاقب، ورافق تكوين هذه الاورام بزوغ الجذور والجذور الثانوية في عدد من المعاملات بنسب منخفضة بلغت (3.3، 4.1)% على التعاقب، قياساً بعينة المقارنة.

ومن الملحوظات ايضاً تغير لون البادرات الملقحة او المكونة للاورام من اللون الاخضر المصفر بعد مرور 25-30 يوماً من زراعتها على الوسط الغذائي WP.

الجدول (40) استجابة بادرات الجت *M. sativa* للتلقيح المباشر بكثافات مختلفة من لقاح بكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً

<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)				<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)				الكثافة الضوئية (OD) للقاح
تكوينها للجذور (%)	مدة بدء تكوين الاورام التاجية (يوم)	تكوين الاورام التاجية (%)	أعداد البادرات الملقحة/ المستجيبة	تكوينها للجذور (%)	مدة بدء تكوين الاورام التاجية (يوم)	تكوين الاورام التاجية (%)	أعداد البادرات الملقحة/ المستجيبة	
0.0	19	15.6	5/32	0.0	19	10	3/30	0.1
0.0	18	23.3	7/30	0.0	17	19.4	7/36	0.25
1.4	16	42	15/36	3.3	15	40	12/30	0.5
3	15	44.4	16/36	0.0	15	50	15/30	0.75
0.0	13	47.6	20/42	4.1	13	54.1	13/24	1.0
6.6	13	53.3	16/30	0.0	18	35.7	15/42	1.5
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	(D.W)

معاملة المقارنة: العينات الملقحة بالماء المقطر المعقم فقط

4.12.4 استحثاث تكوين الاورام التاجية على السيقان تحت الفلقية المستأصلة من بادرات الجت *M. sativa* بحقتها المباشر بكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً

عبرت قطع السيقان تحت الفلقية المستأصلة لنباتات الجت *M. sativa* عن استجابتها للتلقيح المباشر بكتريا *A. tumefaciens* من تكوينها للاورام التاجية في مواقع الحقن ، وتفوق اللقاح ذو الكثافة الضوئية (0.25) OD و (0.1) OD في تكوينها للاورام التاجية على السيقان تحت الفلقية المحقونة بلقاح بكتريا *A. tumefaciens* (AtMc01 بنسب (33.3، 46.6) % على التوالي الجدول (41) ، على الكثافات العالية (1.0 و 1.5) OD التي لم تبد فيها قطع السيقان اي استجابة لتكوين الاورام نتيجة لموت القطع الملقحة والمعزولة في الوسط بعد 10 أيام من التلقيح، في حين سجلت أعلى نسبة (40، 53.3) % لاستجابة السيقان تحت الفلقية بلقاح بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) ذي الكثافة الضوئية (0.25، 0.5) OD على التوالي، ورافق ارتفاع الكثافة الضوئية للقاح انخفاض في معدلات الاستجابة للسيقان المحقونة.

بدأت هذه الاورام بالنشوء على القطع بعد (11-18) يوماً من الحقن وابتدت بهيئة انتفاخات خشنة المظهر وذات لون أخضر أو ابيض (الشكل 25) تطورت في عدد من الحالات لورم كبير في قمة السيقان او عند منطقة التاج .

الجدول (41) استجابة قطع السيقان تحت الفلقية المستأصلة من بادرات الجت *M. sativa* للتلقيح بالحقن المباشر بكثافات متباينة من لقاح بكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً

<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)			<i>A. tumefaciens</i> (AtMc01)			الكثافة الضوئية (OD) لللقاح
مدة تكوين الاورام التاجية	الاستجابة (%)	عدد القطع المصابة	مدة تكوين الاورام التاجية	الاستجابة (%)	عدد القطع المصابة	
16	20	3	13	33.3	5	0.1
14	40	6	11	46.6	7	0.25
12	53.3	8	15	26.6	4	0.5
17	13.3	2	16	6.6	1	0.75
18	6.6	1	0.0	0.0	0.0	1.0
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	المقارنة

تمثل الارقام 15مكرر/ معاملة المقارنة: العينات الملقحة بالماء المقطر المعقم فقط

5.12.4 التكوين التلقائي للافرع الخضرية من الانسجة المحولة وراثياً والمنتجة للاوبين (Nopaline, Octopine) ببكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً

1.5.12.4 الاورام التاجية المحولة وراثياً الناشئة على البادرات الملقحة

من اهم النتائج البارزة في هذه الدراسة الجدول (42) التي لوحظت في أغلب مزارع الاورام التاجية Crown gall المحولة وراثياً والناشئة على البادرات الملقحة بالبكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً، نشوء الافرع الخضرية من هذه الاورام (الشكل 24) فقد أبدت هذه الاورام في عدد من المعاملات تغيراً في اللون الى اللون البني وتطورت منها الاعضاء والاوراق الصغيرة وبدأ تمايز هذه النباتات بعد عدة أيام من تكون الاورام ، وبلغت نسبة التمايز في الاورام التاجية ذروتها (73.3) % في البادرات الملقحة بلقاح بكتريا *A. tumefaciens* (AtMc01) بكثافة ضوئية بلغت (1.0) OD وبدأ تمايز الافرع فيها بعد 22 يوماً من التلقيح بالحقن المباشر، في حين سجلت أعلى نسبة لتمايز البادرات 70% عند التلقيح ببكتريا *A.*

النباتات 22 يوما كان ارتفاعها يقرب من 2-2.5 سم، واتصفت الافرع الخضرية البالغ عددها (1-2) فرع خضري/ ورم، واحتوى كل فرع على 3 أوراق، بقصر اطوالها ولونها الاخضر الغامق وصغر حجم اوراقها والتفافها في عدد من المعاملات وبطء نموها.

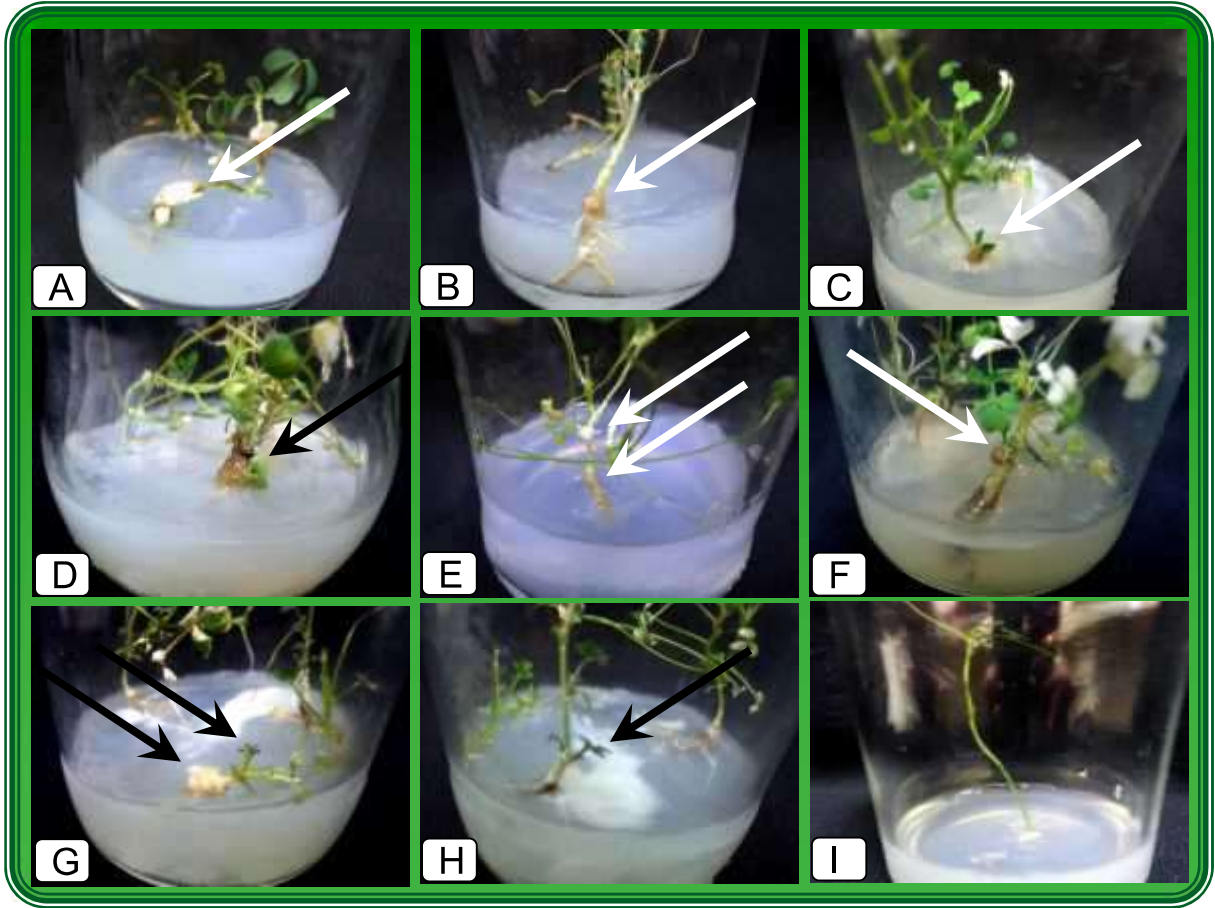
الجدول (42) التكوين المباشر للافرع الخضرية من الاورام التاجية المتكونة على بادرات نباتات

للجنت (*M. sativa*) (Nopaline, Octopine) المحولة وراثياً ببكتريا

A. tumefaciens المعزولة والمحولة وراثياً

<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)				<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)				الكثافة الضوئية (OD) للقاح
تكوينها (%)	مدة تكوينها (يوم)	الاعداد الكلية للافرع الخضرية	عدد المزارع المستخد مة	تكوينها (%)	مدة تكوينها (يوم)	الاعداد الكلية للافرع الخضرية	عدد المزارع المستخد مة	
20	29	2	10	40	28	4	10	0.1
40	27	8	20	45	28	9	20	0.25
50	27	10	20	60	25	12	20	0.5
56.6	25	17	30	60	25	18	30	0.75
60	25	9	15	73.3	22	11	15	1.0
70	22	14	20	30	29	6	20	1.5
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	(D.W)

معاملة المقارنة: العينات الملقحة بالماء المقطر المعقم فقط.



الشكل (24) الاورام التاجية والأفرع الخضرية الناشئة على بادرات الجت *M. sativa* بالحقن المباشر ببيكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً.

D-A. الاورام التاجية والأفرع الخضرية الناشئة على بادرات الجت *M. sativa* بالحقن المباشر ببيكتريا *A. tumefaciens* البرية.

B-A. الاورام التاجية (الجزء المؤشر) على البادرات المحقونة بلقاح البكتريا البرية (*A. tumefaciens*) ذو الكثافة الضوئية (1.0,1.0) على التوالي.

D-C. تشكل الافرع الخضرية (الجزء المؤشر) مباشرة من الاورام التاجية بلقاح البكتريا البرية (*A. tumefaciens*) ذو الكثافة الضوئية (1.0,0.75).

H-E. الاورام التاجية والأفرع الخضرية الناشئة على بادرات الجت *M. Sativa* بالحقن المباشر ببيكتريا *A. tumefaciens* المحولة وراثياً.

F-E. الاورام التاجية (الجزء المؤشر) على البادرات المحقونة بلقاح البكتريا المحولة وراثياً (*A. tumefaciens*) ذو الكثافة الضوئية (1.5,1.0) على التوالي.

H-G. تشكل الافرع الخضرية (الجزء المؤشر) مباشرة من الاورام التاجية بلقاح البكتريا المحولة وراثياً (*A. tumefaciens*) ذي الكثافة الضوئية (1.5,1.0) على التوالي.

I. بادرة جت محقونة بالماء المقطر المعقم (عينة المقارنة).

2.5.12.4 من الاورام التاجية لقطع السيقان تحت الفلقية الملقحة

من النتائج المميزة في هذه الدراسة نشوء الافرع الخضرية من الاورام التاجية لقطع السيقان تحت الفلقية المحقونة وفي مدة أقصر مما هي عليه في البادرات الملقحة بالكثافات الضوئية المنخفضة من اللقاح البكتيري للاكروبيكتريم المسببة للاورام التاجية بنوعها المعزولة والمحولة وراثياً، إذ سجلت أعلى نسبة مئوية لتمايز الافرع من الاورام 73.3% في السيقان الملقحة بلقاح بكتريا *A. tumefaciens* (AtMcol) بكثافة ضوئية بلغت (0.25) OD (الجدول 43) التي نشأت فيها الافرع بعد تسعة عشر يوماً من الحقن لقطع السيقان تحت الفلقية، في حين سجلت أعلى نسبة لتمايز الافرع 66.6% في الاورام التاجية للسيقان المحقونة بلقاح بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) بكثافة ضوئية بلغت (0.5) OD. وتجدر الإشارة الى ان قطع السيقان تحت الفلقية المحقونة بلقاح البكتريا ذي الكثافتين (1.0, 1.5) OD لم تتجح في تحفيز تكوين الافرع الخضرية وانما على العكس من ذلك، إذ فقدت القطع المحقونة بهذه الكثافات حيويتها ولونها الاخضر وتحولت لقطع سوداء ميتة بعد بضعة أيام من الحقن (الجدول 43). وتميزت الافرع الناتجة من الاورام التاجية للسيقان تحت الفلقية المميزات نفسها التي ذكرت للافرع الناشئة من الاورام التاجية للبادرات المحقونة الا انها كانت متميزة بكونها أكثر استطالة والساق أقل سمكاً من نظيراتها وتبكيراً في النشوء مما هي عليه للافرع الناشئة من أورام البادرات (الشكل 25).

الجدول (43) التكوين المباشر للافرع الخضرية من الاورام التاجية المنتجة لـ (Nopaline,) (Octopine) المحولة وراثياً المتكونة على قطع السيقان تحت الفلقية لنباتات الجت *M. sativa* المصابة ببكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً

<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)				<i>A. tumefaciens</i> (AtMcol)				الكثافة الضوئية (OD) للقاح
التمايز (%)	مدة تكوينها (يوم)	الاعداد الكلية للافرع الخضرية	عدد البادرات	التمايز (%)	مدة تكوينها (يوم)	الاعداد الكلية للافرع الخضرية	عدد البادرات	
50	19	5	10	30	23	3	10	0.1
53.3	19	8	15	73.3	19	11	15	0.25
66.6	18	10	15	53.3	21	8	15	0.5
65	22	13	20	10	23	2	20	0.75
0.0	0.0	0.0	15	0.0	0.0	0.0	15	1.0
0.0	0.0	0.0	15	0.0	0.0	0.0	15	1.5
0.0	0.0	0.0	15	0.0	0.0	0.0	15	(D.W)

معاملة المقارنة: العينات الملقحة بالماء المقطر المعقم فقط

الشكل (25) الاورام التاجية والافرع الخضرية الناشئة على قطع السيقان تحت الفلجية لبادرات نباتات الجت المصابة ببكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً، بالحقن المباشر.

D-A. الاورام التاجية والافرع الخضرية الناشئة على قطع السيقان تحت الفلجية بالحقن المباشر ببكتريا *A. tumefaciens* البرية (AtMco1).

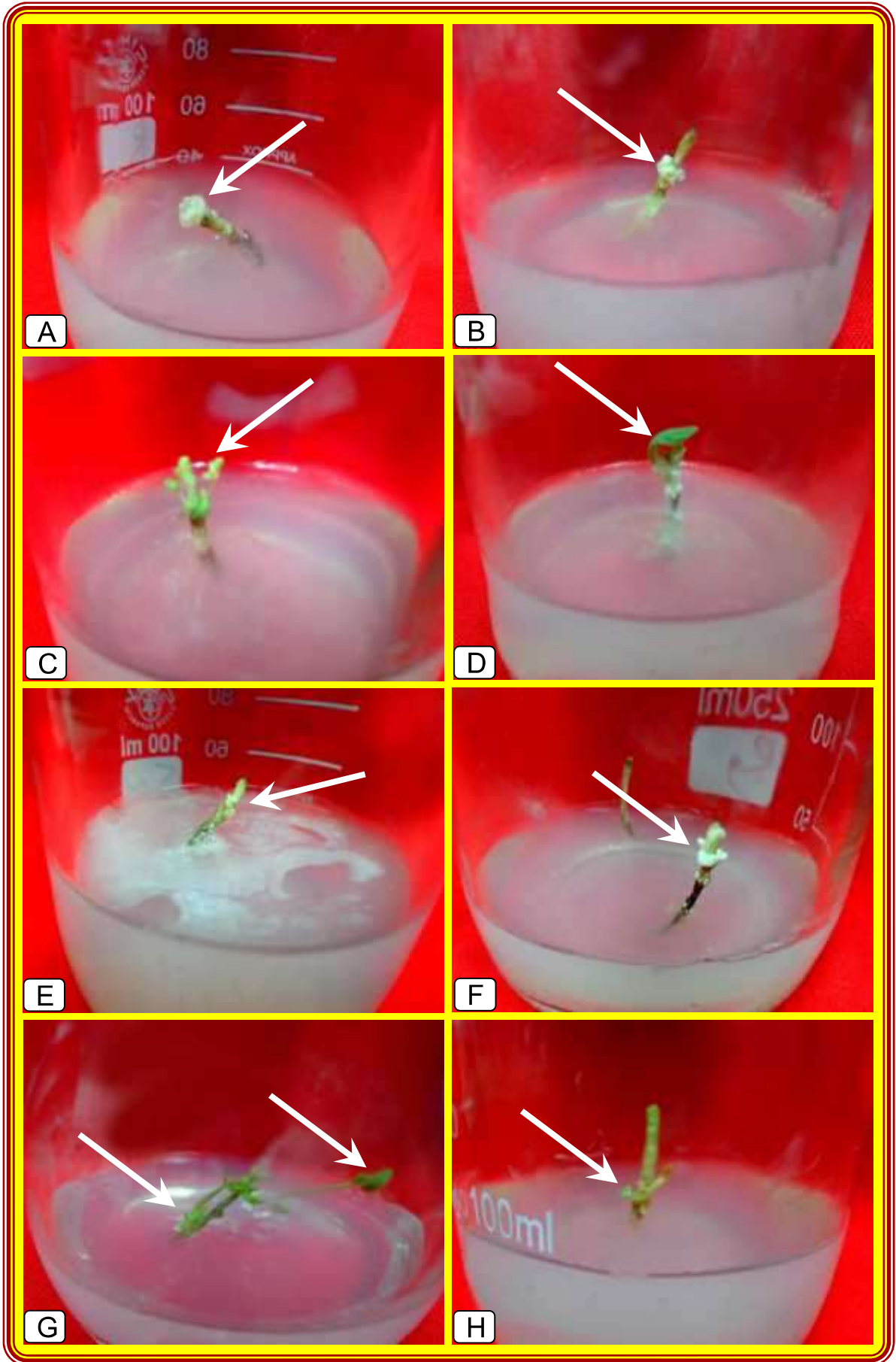
B,A: نشوء الاورام التاجية (الجزء المؤشر) على قطع السيقان تحت الفلجية بالحقن المباشر بلاقح البكتريا ذو الكثافة الضوئية (0.1،0.25) على التوالي.

D, C: تشكل الافرع الخضرية (الجزء المؤشر) مباشرة من الاورام التاجية، بلاقح البكتريا ذو الكثافة الضوئية (0.25) الفقرة (C) و(0.5) الفقرة (D) .

H-E. الاورام التاجية والافرع الخضرية الناشئة على قطع السيقان تحت الفلجية بالحقن المباشر ببكتريا *A. tumefaciens* المحولة وراثياً (C58C1).

F,E: نشوء الاورام التاجية (الجزء المؤشر) على قطع السيقان تحت الفلجية بالحقن المباشر بلاقح البكتريا ذو الكثافة الضوئية (0.25) الفقرة (E) و(0.5) الفقرة (F) .

H,G: تشكل الافرع الخضرية (الجزء المؤشر) مباشرة من الاورام التاجية، بلاقح البكتريا ذو الكثافة الضوئية (0.25) الفقرة (G) و(0.5) الفقرة (H)



6.12.4 تكوين نباتات الجت المحولة وراثياً من مزارع كالس الاورام التاجية

1.6.12.4 انشاء مزارع الاورام التاجية الخالية من بكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً على وسط MSO الصلب وادامتها

بينت النتائج ان نقل مزارع الاورام التاجية 3-4 نقلات متتالية على وسط MSO الصلب الحاوي على 500 ملغم/لتر من المضاد الحيوي Chloramphenicol للاورام الناشئة بفعل بكتريا (*A. tumefaciens* (C58C1) و 1000 ملغم/لتر من المضاد الحيوي Cefotaxime للاورام الناشئة بفعل بكتريا (*A. tumefaciens* (AtMcol) أدى الى تحييدها من هذه البكتريا بدلالة غياب نمو البكتريا في الوسطين (AMM, YEB) السائلين على التوالي الملقحين بمهروس هذه الاورام والمحضنة ثلاثة أيام.

وأظهرت نتائج زراعة قطع الاورام التاجية المستأصلة من البادرات او سيقانها والخالية من البكتريا على وسط MSO الصلب زيادة نمو الاورام وانتفاخها التي تطورت لاحقاً الى مزارع نموذجية لهذه الاورام

2.6.12.4 استحداث كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً على الاوساط الخالية والمدعمة بمنظمات النمو

أظهرت زراعة قطع الاورام التاجية على وسط MSO و MSO1/2 والمدعمن باضافات متباينة من منظمات النمو قابليتها على استحداث الكالس منها وبنسب متباينة (الجدول 43).

ومن النتائج البارزة في هذه الدراسة بدء مزارع الاورام التاجية النامية على وسطي المقارنة MSO و MSO1/2 بالانتفاخ ثم تطورت الى كتل من الكالس بعد 15-18 يوماً من الزراعة على هذين الوسطين، و اتصف الكالس المستحدث بلونه الكريمي وبنيته شبه المتماسكة (الشكل 26)، وتظهر البيانات الواردة في الجدول المار تفوق الوسط NAA 1.0+MS 1/2 في تشجيعه لاستحداث الكالس بدلالة نسبته البالغة 62.2% وهي أعلى من نسبة الاستحداث (45.7%) التي حصلنا عليها حين زراعة الاورام التاجية على وسط MS1/2 المدعم بتركيزين متداخلين من BA(1.0) و NAA(2.0)، ومن ناحية اخرى حفزت هذه الاوساط على تكوين عدد محدود من التراكيب البيضاء اللون الشبيهة بالجذور وتجمعات خلوية امتازت بلونها الاخضر الزاهي على الكالس الناشئ.

الجدول (44) استحداث كالس الاورام التاجية لنباتات الجت *M. sativa* النامية على وسط 1/2 MS الصلب المزود بتراكيز متباينة من منظمات النمو

مدة استحداث الكالس (يوم)	استحداث الكالس (%)	أعداد الاورام المزروعة/ المستحدثة	اوساط الاستحداث (ملغم/لتر)
15	26.6	8/30	MSO 1/2
12	62.2	28/45	NAA 1.0+MS 1/2
17	25	5/25	NAA 1.0+ BA1.0 +MS 1/2
15	45.7	16/35	NAA 2.0+ BA1.0 +MS 1/2
18	25.7	9/35	MSO (المقارنة)

3.6.12.4 ادامة كالس الاورام التاجية المحول وراثياً وتقدير اوزانه الطرية

أظهرت نتائج فصل كتل الكالس الصغيرة الناشئة من الاورام التاجية على اوساط استحداثها (الفقرة 4.1.3.8.3) ووضعها على الاوساط المناسبة نموها الجيد وانشائها مزارع من الكالس الذي تميز ببنيته شبه المتماسكة ولونه الكريمي. واستناداً الى نتائج الجدول (45) اعتمد الوسط NAA 1.0+MS 1/2 كأفضل الاوساط لادامة كالس الاورام التاجية والذي تفوق فيه الكالس في اعطاء اعلى وزن طري لكالس الاورام وبلغ 2.8 غم بالمقارنة مع التداخلات الاخرى لاوساط MS1/2 ومعاملة المقارنة الخالية من منظمات النمو.

الجدول (45) تقدير الاوزان الطرية للكالس المشتق من الاورام التاجية لنباتات الجت *M. sativa*

الوزن الطري (غم)	مصدر الكالس	الوسط الغذائي (ملغم/لتر)
2.5	كالس السيقان تحت الفلقية (المقارنة)	NAA 2.0+Kin 2.0+MS
2.8	كالس الاورام التاجية	NAA 1.0+MS 1/2
2.1	كالس الاورام التاجية	NAA 2.0+ BA 1.0+ MS 1/2
1.8	كالس الاورام التاجية	MSO 1/2

* وزن الكالس 1.0 غم/ معاملة عند الزراعة.

4.6.12.4 تمايز كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً لتكوين الافرع الخضرية

أظهرت نتائج اخضاع كالس الاورام التاجية لمجموعة من تداخلات منظمات النمو الجدول (46) ان قسماً من هذه التداخلات شجعت على نمو الكالس الا انها لم تشجع على تمايزه، فقد أظهرت التجارب صعوبة تمايز الكالس المشتق من الاورام التاجية المحولة وراثياً، ويظهر ذلك واضحاً من سلوك هذه المزارع وايجابيتها في احتوائها على (الاوبين)، بخلاف سهولة تمايز كالس السيقان تحت الفلقية وبمرحلة واحدة على وسط استحداثه، جاءت هذه الملاحظات السلبية الخاصة بصعوبة تمايز هذا الكالس لتعزز مرة أخرى حدوث التحول الوراثي في هذه الانسجة بفعل بكتريا *A. tumefaciens*، ولضرورة الحاجة الى احداث التمايز لهذا الكالس ولزيادة دعم نتائج هذه الدراسة في هذا المجال اختبرت مجموعة من الاوساط MS 1/2 المدعمة باضافات من منظمات النمو شجع أحد تداخلاتها وهو الوسط MS 1/2 + 2.0 ملغم/لتر NAA على تكوين عدد من التراكيب الخضراء اللون (الشكل 26) تكشفت عن اوراق خضراء من كتل هذا الكالس وتطورت في 7 أيام الى افرع خضرية، وامتازت هذه الافرع بنقزمها وبحملها لمجموعة من الاوراق التي امتازت بلونها الأخضر الغامق، وبصغر حجمها، والتفافها، وبلغت النسبة المئوية لتكوينها 35% بالمقارنة مع عينة المقارنة المتمثلة بكالس السيقان تحت الفلقية.

الجدول (46) تكوين الافرع الخضرية للجت *M. sativa* من مزارع كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً

التمايز (%)	مدة بدء تكوينها (يوم)	معدل عدد الافرع/ قطعة	الاعداد الكلية للافرع الناتجة	عدد مزارع الكالس المزروعة/المتمايزة	الوسط الغذائي (ملغم/لتر)	منشأ الافرع الخضرية
20	23	3	24	8/40	2,4-D 2.0+Kin 2.0+ MS	كالس السيقان تحت الفلقية (المقارنة)
35	21	2	28	14/40	NAA 2.0+1/2MS	كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً

5.6.12.4 تحفيز استطالة الافرع الخضرية في وسط الاستطالة

أظهرت نتائج معاملة الافرع الخضرية بأنواعها الناتجة من الاورام التاجية أو كالسها بغرسها في وسط الاستطالة الحاوي على MS + فيتامين B5 + 1 ملغم/لتر Zit + 0.5 ملغم/لتر GA + 0.1 ملغم/لتر IAA + 50 ملغم/لتر كلوتامين + 3% سكروز الى تحفيز استطالة الافرع المتميزة عن نظيراتها غير المعاملة، إذ اظهرت النتائج استطالة الافرع الخضرية من 3-6 سم حين وضعها مغروسة قائمة في هذا الوسط بعد اسبوعين من المعاملة.

الشكل (26) استحداث وتمايز كالس الاورام التاجية المحولة وراثيا (المستحدثة) ببكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً على منطقة السيقان تحت الفلقية لبادرات الجت *M. sativa*

A. E - استحداث كالس الاورام التاجية المحولة وراثيا ببكتريا *A. tumefaciens* البرية (AtMco1) وتمايزه.

A. الورم التاجي على السيقان تحت الفلقية المستأصلة من البادرات المصابة.

B. بدء استحداث كالس من الورم التاجي في (A) على سطح وسط الاستحداث (1.0+MS 1/2 ملغم/لتر NAA).

C. كالس الورم التاجي من (B) بعمر 45 يوماً على وسط الاستحداث.

D. بدء تشكل الافرع الخضرية (الجزء المؤشر) من كالس الاورام التاجية في (C).

E. الافرع الخضرية من كالس الاورام التاجية في (D) بعمر (18) يوم.

F - J. استحداث كالس الاورام التاجية المحولة وراثيا ببكتريا *A. tumefaciens* المحولة وراثيا (C58C1) وتمايزه.

F. الورم التاجي على السيقان تحت الفلقية المستأصلة من البادرات المصابة.

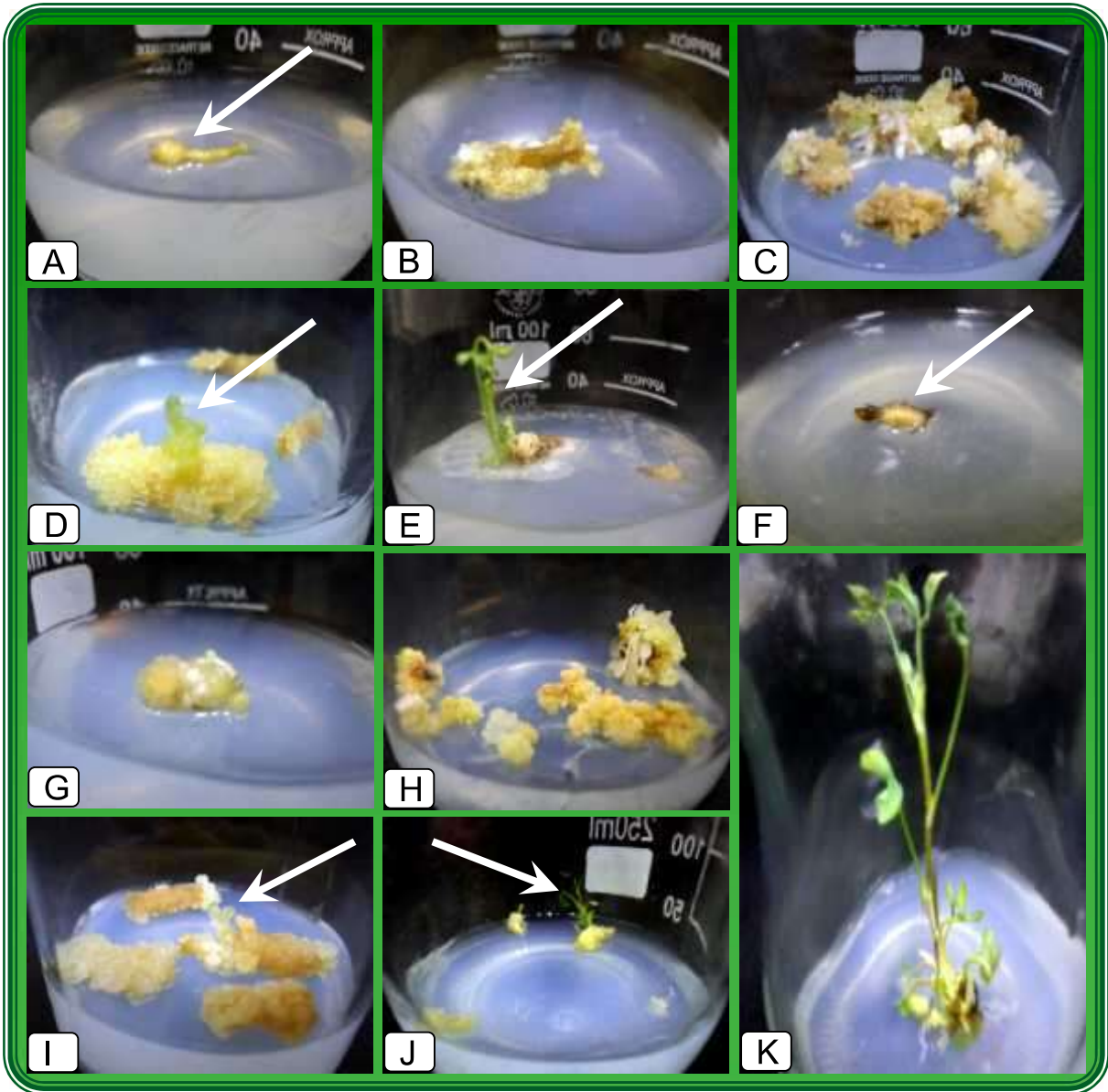
G. بدء استحداث كالس من الورم التاجي في (F) على سطح وسط الاستحداث (1.0+MS 1/2 ملغم/لتر NAA).

H. كالس الورم التاجي من (G) بعمر 45 يوماً على وسط الاستحداث.

I. بدء تشكل الافرع الخضرية (الجزء المؤشر) من كالس الاورام التاجية في (H).

J. الافرع الخضرية من كالس الاورام التاجية في (I) بعمر (12) يوم.

I. استطالة الافرع الخضرية المحولة وراثياً على وسط الاستطالة (MS+BS Vit+ 1 mg.L⁻¹ Zit+0.5 mg.L⁻¹ GAA+0.1 mg.L⁻¹ IAA+ 50 mg.L⁻¹ glutamine + 3% Sucrose



13.4 الدلائل المظهرية والوراثية للتحويل الوراثي في انسجة نباتات الجت *M. sativa*

1.13.4 اختلاف الصفات المظهرية والوراثية لكالس الاورام التاجية المحول وراثياً عن نظيره الناتج عن السيقان تحت الفلقية

أظهرت البيانات الواردة في الجدول (47) وجود مجموعة من الاختلافات المظهرية والوراثية لكالس الاورام التاجية الناشئة على السيقان تحت الفلقية بفعل التلقيح بالبكتريا *A. tumefaciens*، عن نظيره كالس السيقان تحت الفلقية الاعتيادية. إذ تميز الاول بمقاومته للريفامبيسين والجينتاميسين وتكوينه للجذور والتراكيب الشبيهة بالجذور واحتواء كاله على عدد من التجمعات الخلوية الخضراء ولونه الكريمي المائل الى الغامق وطبيعته شبه المتماسكة، على النقيض من كالس السيقان تحت الفلقية الذي امتاز بفقدانه لهذه المواصفات الخاصة بمقاومة المضادات الحيوية وتكوينه للجذور والتجمعات الخلوية وتميز بلونه الكريمي وطبيعته الهشة.

الجدول (47) اختلاف الصفات المظهرية بين الكالس الطبيعي للجت *M. sativa* وكالس الاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens*

كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً	كالس السيقان تحت الفلقية	الصفات المظهرية
كريمي غامق	كريمي	اللون
+	-	تكوين الجذور من الكالس
+	-	مقاومة الكالس للريفامبيسين والجينتاميسين
+	-	تكوين تجمع خلوي أخضر اللون على الكالس
شبه متماسك	هش	طبيعة الكالس

(-) : فقدان الصفة (+) : امتلاك الصفة

2.13.4 نمو كالس الاورام التاجية المحول وراثياً في الاوساط الانتخابية المدعمة بالمضادين الحيويين الريفامبيسين والجينتاميسين

A. أظهرت نتائج تنمية كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً والناشئة بفعل بكتريا *tumefaciens* والمنتجة لـ (Nopaline, Octopine) على وسط MS1/2 الصلب المدعم باضافة 1.0 ملغم/لتر NAA بوجود (100، 40) ملغم/لتر من الريفامبيسين والجينتاميسين على التوالي تحمله لهذين المضادين بدلالة الزيادة الحاصلة في نمو الكالس واحتفاظه بلونه الكريمي، وتمت اعادة زراعته كل ثلاثة اسابيع على الوسط المذكور انفا.

ويمكن الاستدلال من هذا على انتقال الجينات الواقعة على قطعة T-DNA التي من ضمنها جينات المقاومة لهذين المضادين المحمولة على بلازميدي كل من البكتريا البرية والمحولة وراثياً، اذ يمثل انتقال هذين الجينين دليلاً حاسماً للانتقال المتوقع لجينات T-DNA من هذين البلازميدين التي سيرد ذكرها لاحقاً حين الكشف عنها بتقانة PCR.

3.13.4 قدرة الافرع الخضرية المتمايزة من الاورام التاجية وكالسها المحول وراثياً من النمو في الاوساط الانتخابية الحاوية على الريفامبيسين والجينتاميسين

A. أظهرت الافرع الخضرية المتمايزة من كالس الاورام التاجية المحفزة بيكتريا *tumefaciens* (C58C1) قابليتها على النمو في وسط التمايز الحاوي على (100، 40) ملغم/لتر من الريفامبيسين والجينتاميسين على التوالي و(250، 40) ملغم/لتر من الريفامبيسين والجينتاميسين على التوالي في حالة الافرع الناشئة من كالس الاورام التاجية المحفزة بيكتريا *A. tumefaciens* (AtMcoI) ولم يظهر على هذه الافرع علامات الذبول والاصفرار واتصفت بنشاطها واعطائها افرعاً اضافية نشأت من قاعدة الافرع النامية في الوسط، وكذلك الحال للافرع الناشئة من الاورام التاجية التي غرست في وسط MSO الحاوي على التراكيز المذكورة انفاً من المضادات الحيوية التي قاومت وجودها في هذه الاوساط أكثر من اربعة أسابيع، في حين فشلت الافرع الخضرية المتمايزة من كالس السيقان تحت الفلجية (عينات المقارنة) في نموها في وسط تمايزها 2,4-D 2.0+Kin 2.0+MS الحاوي على هذه المضادات الحيوية بعد 12-18 يوماً من زراعتها عليه. إذ بدت على الافرع المعاملة بهذه المضادات ظاهرة الذبول والاصفرار والموت.

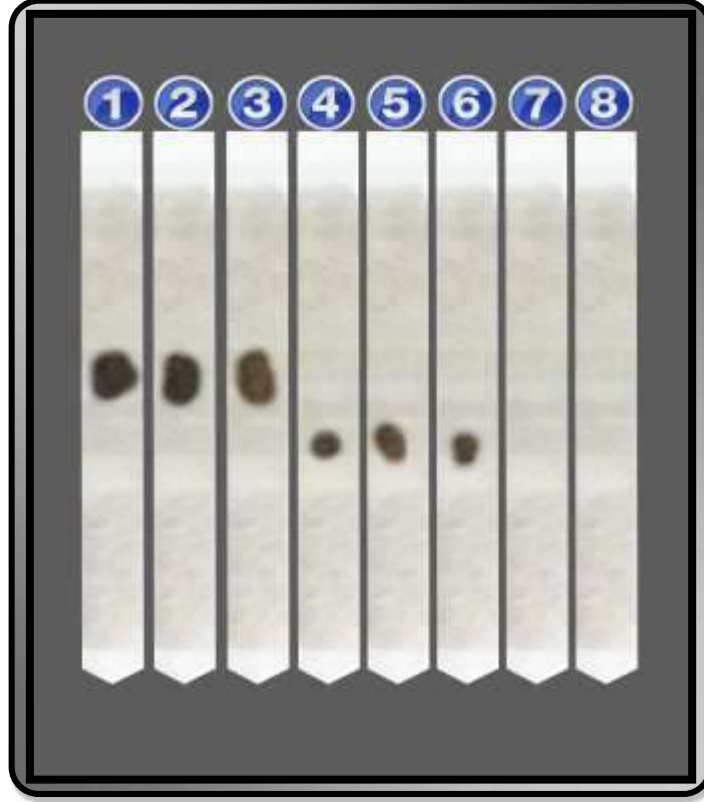
4.13.4 الكشف عن نوع الاوبين (Nopaline, Octopine) في انسجة الاورام التاجية والكالس المشتق منها، وتحديد النمط الوراثي للبكتريا (الكروماتوكرافي النازل)

أظهرت نتائج الترحيل لمستخلصات الاورام التاجية الناشئة على البادرات المحقونة بالبكتريا البرية *A. tumefaciens* (AtMco1) والكالس الناشئ عنها انفصال بقع الاوبينات بلونها (الاسود) حسب ما هو واضح في الجدول (48) الشكل (27). فانها مناظرة في مواقعها لبقع Octopine وغياب ظهورها من مستخلصات السيقان تحت الفلجية الاعتيادية وكالسها ، وأظهرت نتائج الجدول المار انفصال بقع للاوبين من مستخلصات الاورام التاجية الناشئة بفعل بكتريا *A. tumefaciens* (C58C1) وكالسها مناظرة في مواقعها لبقع لنopaline وغياب ظهورها من مستخلصات السيقان تحت الفلجية الاعتيادية وكالسها.

وأظهرت هذه النتائج نوع البلازميد المحمول في كل منها، اذ كشفت امتلاك العزلة البرية لبلازميد من نوع Octopine type وامتلاك السلالة القياسية بلازميد من نوع Nopaline type بدلالة الفرق الواضح في مواقع بقعها حين مقارنتها مع المركبات القياسية (Standard)، وتعزز هذه النتائج الخاصة بالكشف عن هذه الاحماض الامينية (غير الحقيقية) التي يقتصر بناؤها حين تداخل هذه البكتريا مع عوائلها والتي ينتج عنها مظاهر بايولوجية متضمنة تكون الاورام التاجية على سيقان البادرات المحقونة والمنتية بتحول هذه الانسجة وراثيا كفاءة كل من بكتريا *A. tumefaciens* Octopine type البرية و *A. tumefaciens* Nopaline type المحولة وراثيا في الحصول على الانسجة المحولة وراثيا بدلالة الاوبينات المتولدة في هذه الانسجة (الشكل 27).

الجدول (48) نوع الاوبينات المفصولة من مستخلصات الاورام التاجية للبادرات المحقونة ببكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثيا والكالس الناشئ منها.

نوع الاوبين		مصدر الاوبين	العزلة البكتيرية
Napoline	Octopine		
-	+	الاورام التاجية	<i>A. tumefaciens</i> (AtMco1)
-	+	الكالس	
+	-	الاورام التاجية	<i>A. tumefaciens</i> (C58C1)
+	-	الكالس	



الشكل (27) كروموتوكرافيا انفصال بقع الاوبيينات (Nopaline, Octopine) من مستخلصات الاورام التاجية لنباتات الجت *M. sativa* المستحثة بيكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً والكالس المشتق منها.

1. بقعة الـ Nopaline القياسية.
2. بقعة الـ Nopaline المفصولة من الاورام التاجية المستحثة بيكتريا *A. tumefaciens* المحولة وراثياً.
3. بقعة الـ Nopaline المفصولة من كالس الاورام التاجية المستحثة بيكتريا *A. tumefaciens* المحولة وراثياً.
4. بقعة الـ Octopine القياسية.
5. بقعة الـ Octopine المفصولة من الاورام التاجية المستحثة بيكتريا *A. tumefaciens* البرية.
6. بقعة الـ Octopine المفصولة من كالس الاورام التاجية المستحثة بيكتريا *A. tumefaciens* البرية.
7. مستخلص السيقان تحت الفلجية.
8. مستخلص كالس السيقان تحت الفلجية.

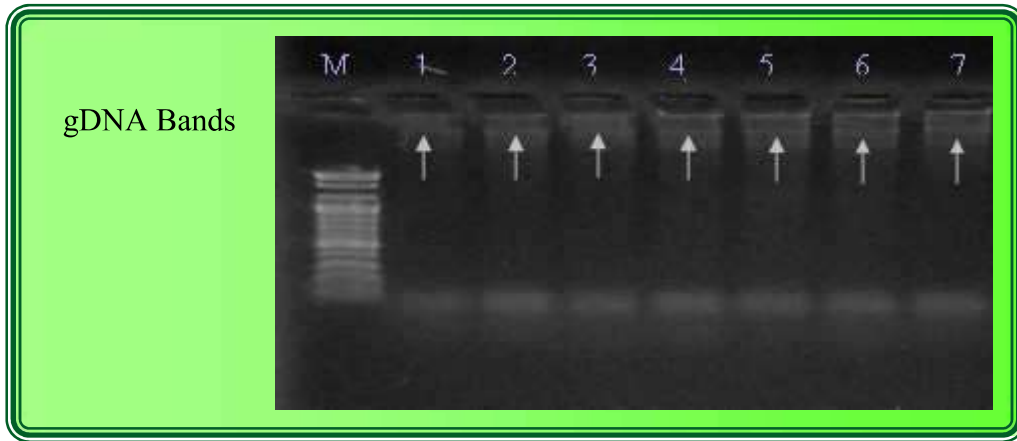
14.4 الكشف عن التحول الوراثي لنباتات الجت عند المستوى الجزيئي

1.14.4 تركيز الحمض النووي DNA المعزول من الانسجة النباتية لنباتات الجت *M. sativa* المحولة وراثياً ونقاوته

أوضحت البيانات الخاصة بتركيز الحمض النووي DNA (الجدول 49) المعزولة من انسجة الاورام التاجية وكالسها والافرع الناتجة عنهما تفوق تركيزه في كالس الاورام التاجية المتكونة على السيقان تحت الفلقية عن تركيزه من كالس قطع السيقان تحت الفلقية، وكذلك الحال في تركيزه المعزول في الافرع الخضرية المتميزة من كالس الاورام التاجية مقارنة بتركيزه من الافرع المتميزة من كالس السيقان تحت الفلقية (الجدول 49)، وأظهرت النتائج نقاوة الحمض النووي DNA المعزول من السيقان تحت الفلقية وكالسها والاورام التاجية وكالسها المحول وراثياً بـ *A. tumefaciens* المعزولة والمحولة وراثياً والافرع الناتجة عنها بمعدل نقاوة تراوح ما بين 1.6-1.8 وبدلالة انفصال حزم الحمض النووي DNA في طبقة هلام الاكاروز دون تقطعها (الشكل 28)

الجدول (49) تركيز الحمض النووي DNA ونقاوته المعزول من انسجة كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات الجت *M. sativa* وكالس الاورام التاجية المحولة وراثياً بـ *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً والنباتات الناتجة منها

النقاوة	تركيز الحمض النووي (نانوغرام.مايكروليتر ⁻¹)	مصدر الحمض النووي المعزول	
1.6	988	قطع السيقان تحت الفلقية	الاجزاء النباتية
1.7	1098	الاورام التاجية	
1.8	1680	كالس السيقان تحت الفلقية	انسجة الكالس
1.6	1796	كالس الاورام التاجية	
1.6	1540	النباتات الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية	النباتات المتميزة
1.7	1920	النباتات الناتجة من الاورام التاجية	
1.7	1854	النباتات الناتجة من كالس الاورام التاجية	



الشكل (28) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% لمحتوى الـ DNA الجينومي لكالس السيقان تحت الفلقية والاورام التاجية المحولة وراثياً ببكتريا *Agrobacterium tumefaciens* والنباتات الناتجة منها.

المسار (M): الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي.

المسار (1): gDNA المعزول من السيقان تحت الفلقية.

المسار (2): gDNA المعزول من كالس السيقان تحت الفلقية.

المسار (3): gDNA المعزول من الافرع الخضرية الناتجة من كالس السيقان تحت الفلقية.

المسار (4): gDNA المعزول من الاورام التاجية.

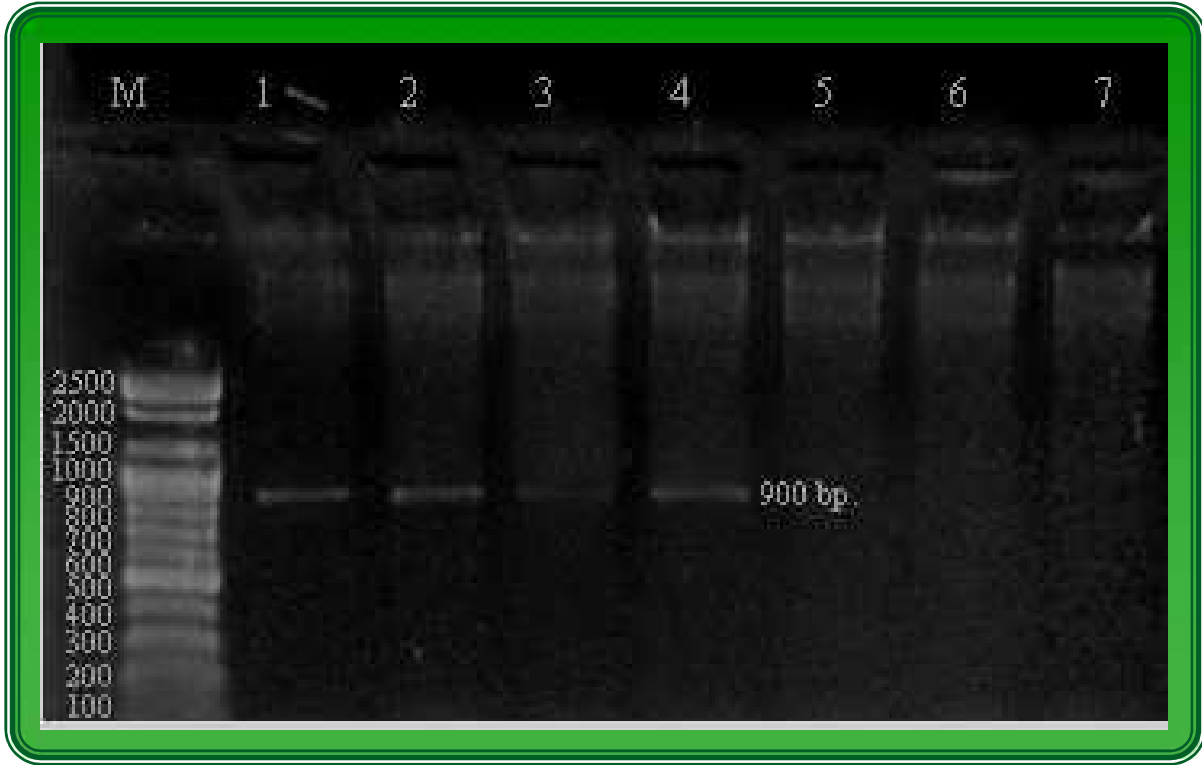
المسار (5): gDNA المعزول من كالس الاورام التاجية.

المسار (6): gDNA المعزول من الافرع الخضرية الناتجة من الاورام التاجية.

المسار (7): gDNA المعزول من الافرع الخضرية الناتجة من كالس الاورام التاجية.

2.14.4 ثبات التعبير الجيني لجينات T-DNA في انسجة نباتات الجت *M. sativa* المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً

بينت الصفات المظهرية Phenotypic characteristics لمجموعة الافرع الخضرية المتميزة من انسجة نباتات الجت *M. sativa* قيد الدراسة وجود تحول وراثي واضح في عدد من الصفات المظهرية وجاء هذا متوافقاً مع نتائج المسح الجزيئي Molecular Screening لاثبات انتقال T-DNA وتداخلها مع جينوم انسجة نباتات الجت المحولة وراثياً من خلال الكشف عن وجود الجين *rol-B* باعتماد البادئ الخاص بذلك بتقانة Gradient-PCR، إذ اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز لعينات نواتج التفاعل التضاعفي sPCR المعرض لمصدر الاشعة فوق البنفسجية Ultra-Violet التي حددت ببرنامج CS Analyzer من التحديد شبه الكمي للحزم حزمياً واضحة ومنفردة عند الحجم الجزيئي 900 زوج قاعدي ناتجة عن الحمض النووي DNA المضخم للاورام التاجية وكالسها والافرع الناشئة عنها لنباتات الجت المحقونة بكل من بكتريا *A. tumefaciens* (AtMc01) الشكل (29) *A. tumefaciens* (C58C1) الشكل (30) ويؤكد وجود هذه الحزم المنفردة للبادئ المستعمل وجود الجين *rol-B* في جينوم خلايا الاورام المحولة وراثياً وكالسها والافرع الناشئة منها وغياب انفصال مثل هذه الحزم من الحمض النووي DNA المضخم والمعزول من خلايا السيقان وكالسها والافرع الناشئة منها (الشكل 29، 30) على التوالي. وتؤكد هذه النتائج بصورة قاطعة احتفاظ انسجة الاورام المحولة وراثياً وكالسها والافرع الناشئة عنها بالجين *rol-B* ودوره في تنشيط فعل جينات المقاومة للريفامبيسين Rif والجينتاميسين Gent نتيجة انتقالها من النواقل البكتيرية لكل من بكتريا *A. tumefaciens* البرية والمحولة وراثياً الى جينوم الخلايا المستقبلة ونجاح تعبيرها، فقد عبر نجاح التعبير الجيني لجين المقاومة للريفامبيسين على قدرة كالس الاورام حين نموه على الوسط المدعم باضافة (100، 40) ملغم/لتر من الريفامبيسين والجينتاميسين على التوالي وكذلك الافرع الخضرية في وسط تمايزها +MS1/2 2.0 ملغم/ لتر NAA والمدعم بالمضادين الحيويين المذكورين بدلالة احتفاظها بحيويتها وزيادة عدد افرعها المتكونة، في حين عبر نجاح التعبير الجيني للجين *rol-B* من دوره الواضح في انتاج الافرع الخضرية التي بلغت اعدادها (28) فرعاً من كالس الاورام مقارنة باعدادها الناشئة من كالس السيقان تحت الفلقية البالغ عددها (24) فرعاً، فضلاً عن الافرع الخضرية الناشئة مباشرة من الاورام التاجية للبادئات المحقونة بلقاح البكتريا مؤكدة للدور الذي يلعبه هذا الجين في السيطرة على انقسام الخلايا المرستيمية الجديدة التي تتطور الى عضو معين متأثرة بأدنى التراكم من منظمات النمو المضافة بشكل عام والاكسينات بشكل خاص. وتبين النتائج السابقة ان الحمض النووي المنتقل T-DNA ينشط فعله الجيني ضمن الحمض النووي المنتقل اليه، وهذا ما ظهر جلياً في عينات النبات من طروء صفات مظهرية جديدة على تلك العينات.



الشكل (29) وجود الجين *rol-B* في عينات الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة من أنسجة نباتات الجت *M. sativa* المحولة وراثياً ببيكتريا *A. tumefaciens* (AtMc01) البرية باستخدام الترحيل الكهربائي 1.5% في الاكاروز.

المسار (M): الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي

المسار (1): DNA المضخم المعزول من الاورام التاجية الناشئة للبادرات الملقحة ببيكتريا *A. tumefaciens* (AtMc01)

المسار (2): DNA المضخم المعزول من كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً

المسار (3): DNA المضخم المعزول من الافرع الخضرية الناشئة من الاورام التاجية المحولة وراثياً

المسار (4): DNA المضخم المعزول من الافرع الخضرية الناشئة من كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً

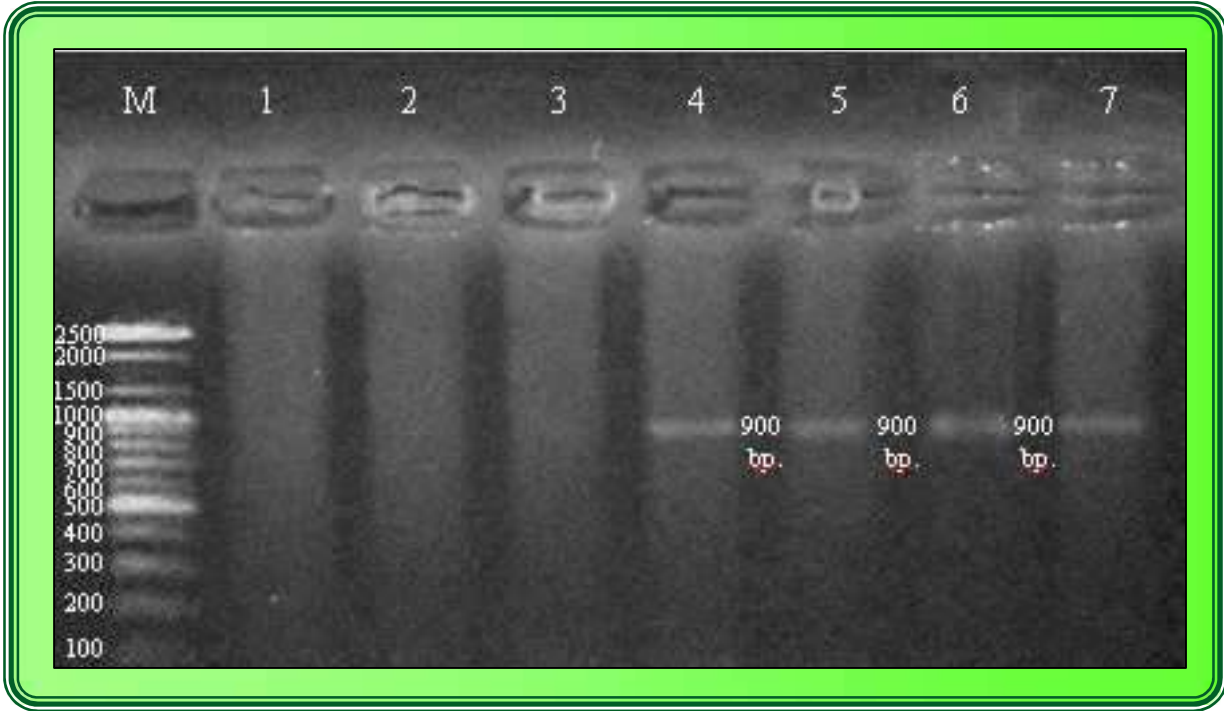
المسار (5): DNA المضخم المعزول من السيقان تحت الفلقية للبادرات غير الملقحة (معاملة المقارنة)

المسار (6): DNA المضخم المعزول من كالس السيقان تحت الفلقية الاعتيادية

المسار (7): DNA المضخم المعزول من الافرع الخضرية لكالس السيقان تحت الفلقية الاعتيادية.

الجدول (50): القراءة الرقمية لتواتج تضخيم الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة من أنسجة نباتات الجت *M. sativa* المحولة وراثياً بـ بكتريا *A. tumefaciens* (AtMc01) باستخدام الباديء (CPF,CPR)، CS Analyzer.3.1، (ATMc01)

عينات الـ DNA الجينومي المضخمة										الاوزان الجزيئية للدليل الحجمي
الافرع الناشئة من كالس الاورام	الافرع الناشئة من الاورام	كالس الاورام التاجية	الاورام التاجية	الافرع الخضريّة الناشئة من كالس السيقان	الافرع الخضريّة الناشئة من كالس السيقان	كالس السيقان تحت الفاقية	السيقان تحت الفاقية			
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2500
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1500
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	900
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	800
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	700
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	600
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100



الشكل (30) وجود الجين *rol-B* في عينات الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة
 انسجة نباتات الجت *M. sativa* المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens* (C58C1)
 البرية باستخدام الترحيل الكهربائي 1.5% في الاكاروز
 المسار (M): الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي.
 المسار (1): DNA المضخم المعزول من السيقان تحت الفلجية للبادرات غير الملقحة
 (معاملة المقارنة).
 المسار (2): DNA المضخم المعزول من كالس السيقان تحت الفلجية الاعتيادية.
 المسار (3): DNA المضخم المعزول من الافرع الخضرية لكالس السيقان تحت
 الفلجية الاعتيادية.
 المسار (4): DNA المضخم المعزول من الافرع الخضرية الناشئة من كالس الاورام
 التاجية المحولة وراثياً.
 المسار (5): DNA المضخم المعزول من الافرع الخضرية الناشئة من الاورام التاجية
 المحولة وراثياً.
 المسار (6): DNA المضخم المعزول من كالس الاورام التاجية المحولة وراثياً.
 المسار (7): DNA المضخم المعزول من الاورام التاجية الناشئة للبادرات الملقحة
 ببكتريا *A. tumefaciens* (C58C11).

الجدول (51): القراءة الرقمية لتواتج تضخيم الحمض النووي DNA المضخمة والمستخلصة من أنسجة نباتات الجت *M. sativa* المحولة وراثياً بـ بكتريا *A. tumefaciens* القياسية باستخدام الباديء (CPF,CPR) ، CS Analyzer.3.1، (C58C1)

عينات الـ DNA الجينومي المضخمة										الاوران الجزيئية للدليل الجمي
الافرع الناشئة من كاس الاورام	الافرع الناشئة من الاورام	كاس الاورام التاجية	الاورام التاجية	الافرع الخضري الناشئة من كاس السيقان	الافرع التاجية	الافرع التاجية	الافرع التاجية	الافرع التاجية	الافرع التاجية	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2500
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1500
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	900
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	800
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	700
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	600
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

يؤكد تمكن الدراسة الحالية من عزل بكتريا *A.tumefaciens* المسببة للاورام التاجية المتكونة على نباتات الأوس *Myrtus communis* استيطان هذه البكتريا في التربة ومقدرتها على احداث الاصابة اذا توفرت الظروف البيئية الملائمة (Collins, 2001).

وشخصت البكتريا اعتماداً على كل من الخصائص المظهرية والوراثية والاختبارات الكيموحيوية فضلاً عن اختبار قدرتها الامراضية بدلالة تكوينها للاورام على النباتات المختبرة قيد الدراسة، وقد برهنت نتائج الاختبارات ان البكتريا المعزولة هي *A.tumefaciens* أو (*Rhizobium radiobacter*) وذلك حسب التغيرات في التسميات والتصنيف الهرمي المقترح من قبل Young وآخرون (2001).

ونظراً لتطابق نتائج الاختبارات الكيموحيوية مع ما ورد ذكره ضمن Bergeys manual و (*Holt et al., 1994*) of determinative bacteriology شخصت البكتريا ايضاً انها *A.tumefaciens* وليست *Agrobacter rhizogenes* (*Rhizobium rhizogenes*) بسبب نموها الواضح على الاوساط الغذائية من دون حاجتها الى عوامل النمو المعروفة مثل البايوتين او الثايمين فضلاً عن نموها على وسط الماكونكي واكتسابها للصبغة على وسط Ferric ammonium citrate و انتاجها 3-ketolactose ونموها على الاوساط الانتخابية التي تعد من مميزات هذه البكتريا (Young et al., 2001; Kerr, 1969; Chen et al., 1999)، وجاءت حساسيتها للمضادين الحيويين Kan و Cef لتؤكد ايضاً انها ليست *Ochrobacterium anthropi* المستوطنة للتربة (Higgins, 2001; Bizet & Bizet, 1995)، وتؤكد البيانات الاولية المتحققة من تداخل البكتريا المعزولة بدلالة تكوين التراكيب الشبيهة بكتل الكالس على سطح اقراص الجذور الخازنة للجزر ودرنات البطاطا (المجروحة) الملقحة ببكتريا *A.tumefaciens* المعزولة وتطورها الى اورام قياساً بعينة المقارنة *A.tumefaciens* (C58C1)، نتيجة لتحفيز الجروح المتكونة على تكوين مجموعة من المركبات الضرورية كالاسيتوسيرنكون او المركبات الفينولية التي تعمل عوامل جذب كيميائية لهذه البكتريا لتمييز من خلالها الجينات المحمولة على قطعة الحمض النووي T-DNA والتي تندمج لاحقاً مع الذخيرة الوراثية للنظام النباتي (Zambryski, 1988)، ويرجح تفسيرها غالباً من قبل العديد من الباحثين الى انتقال جينات (Oncogenicity genes) الموجودة في قطعة الـ T-DNA التي منها *tmr* gene والتعبير عن نفسها بتصنيع الانزيمات الخاصة ببناء السايبتوكاينين داخل الخلايا، مسببة اخلاً في التوازن الهرموني في المواقع المصابة لتحفز على تكوين الاورام ونموها (Rhouma et al., 2006) وذلك بسبب الاضطراب الهرموني المترتب من تداخل هذه الجينات مع جينوم النبات المصاب (Rajbir et al., 1992)، وقد جاءت هذه النتائج دلائل

اضافية تدعم الاختبارات الكيموحيوية في ان البكتريا المعزولة تعود لجنس *A.tumefaciens* التي تسبب مرض الاورام التاجية. (Soriful et al.,2010;Marja et al.,2004) ، واكدت النتائج ايضا ان البكتريا المعزولة واقعة ضمن Biovar I وليست Biovar II وذلك لكونها متحركة وذات قدرة على النمو في الاوساط القاعدية وجاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج الدراسة التي اجراها Hacene وجماعته (1993)، التي اكد فيها ان (56)% من البكتريا المعزولة من التربة تعود لـ Biovar I وتتميز بقدرتها على تكوين الاورام التاجية على النباتات، ولا تعود لـ Biovar III وذلك لعجز البكتريا الواقعة ضمن هذه الطراز عن الحركة عند الاس الهيدروجيني المرتفع باتجاه القاعدية (Bush, 1991).

ويرجع اهتمامنا في الكشف عن هذه البكتريا وعزلها من الاورام التاجية المتكونة على نباتات الآس *Myrtus Communis* وليس من التربة لسببين اولهما سهولة عزلها من الاورام فضلاً عن انخفاض نسبة اعدادها في التربة (Kerr, 1969) ويفسر سبب اصابة نباتات الآس بهذه البكتريا الى الظروف المناخية التي تسهم بشكل كبير في الاصابة وانتشار البكتريا حول منطقة الجذور (Collins, 2001). ومن ناحية أخرى فإن قلة اصابتها للنباتات النامية في الترب العراقية لا يعني غياب هذه البكتريا وانما يعود الى نقص الوحدات المتكاملة لحدوث المرض وتطوره التي تتضمن كلاً من المضيف النباتي الذي له القابلية للاصابة والظروف البيئية القياسية مثل درجة الحرارة (Schell, 1979) أو بفعل العمليات الزراعية المختلفة والحشرات أو الآفات وديدان النيما تودا التي تُعد منفذاً طبيعياً لاختراق البكتريا المسببة لهذا المرض (Burr et al., 1999; Burr, 1998) او لانتاج النباتات لعدد من المضادات الحيوية في عملياتها الايضية التي تؤثر سلباً في نمو البكتريا وتواجدها بالقرب منها في التربة (Sahi, 1990) او لتحفيز البكتريا لبرنامج داخل الجسم النباتي يعمل على موت موضعي للخلية النباتية المصابة مما يقلل من ظهور هذه الاصابات وتكاملها على النباتات (Hansen, 2000) فضلاً عن تباين مستويات الحساسية للمرض من نبات الى آخر قد يكون سبباً آخر للمقاومة وثم انخفاض نسبة الاصابة (Pierronnet & Salesses.,1996) وعليه وطبقاً لما ورد فان البكتريا المعزولة والمختبرة قيد الدراسة هي *A.tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) بنسبة لا تقل عن 95% (Marja et al., 2004)، ويرجع اهتمامنا بموضوع عزل هذه البكتريا من الاورام التاجية التي تُعد الدراسة الاولى على مستوى القطر لاهميتها بوصفها ناقلاً في عمليات التحول الوراثي ولكونها احد القواعد الاساسية ضمن برامج التقانات الحيوية للحصول على نباتات محولة وراثياً من الاورام التاجية، هذا فضلاً عن امكانية تحويلها للسيطرة على عمليات التحول الوراثي في النباتات (Soriful et al. , 2010; Gustavo et al., 1998).

من جانب آخر تمكنت الدراسة الحالية من عزل 4 عزلات تعود للذئبل *S.meliloti* وتشخيصها من الععد الجذرية لاربعة اصناف نباتية للجت وذلك بالاعتماد على خصائصها المظهرية والوراثية والاختبارات الكيموحيوية والبايولوجية الخاصة بالتخصص العائلي اذ تطابقت صفاتها المظهرية المتمثلة بكونها عصوية قصيرة غير متجرثمة عند الفحص بالمجهر الضوئي سالبة لصبغة كرام، تنمو جيداً على بيئة المانيتول ومستخلص الخميرة، كما انها اخذت اشكالاً مختلفة متفرعة أو غير منتظمة عرفت بالبكتريود داخل الععد الجذرية التي يندر وجودها في المزارع النامية على البيئات الاصطناعية (Kersters&Deley, 1984) وامتلاكها القدرة على الحركة وايجابيتها في فحص الاوكسديز والكتاليز، وسلبيتها في انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين طبقاً لما ذكره Bano & Erum (2008) وتخميرها للعديد من الكربوهيدرات كالكوكوز والسكرور مع انتاج الحامض، بدليل تحويل لون الوسط الى الاصفر، بدون انتاج الغاز (Kersters&Deley, 1984)، فضلا عن اكتسابها لصبغة Congo red في الوسط الحاوي عليها دليلاً على انتاجها للبيفات. Cellulose، اذ تلون هذه الصبغة amyloid و Cellulose وتتداخل مع β -D-glucan وترتبط مع السكريات المتعددة الموجودة في كبسولة البكتريا (Wood,1980) وتباينت مع الاكروبيكتريوم في عدم انتاجها لمركب 3-Ketolactose بدلالة عدم تكوين الحلقة الصفراء حول المستعمرات النامية على وسط اكار اللاكتوز حين غمرها بمحلول Bendor's reagent والذي اتفق مع ما اشار اليه Don وآخرون (2005) حين تشخيصه هذه البكتريا بدلالة تكوينها لمركبات عديدة السكريات الخارجي exopolysucharides مما له دوراً مهم في اصابة المضيف النباتي المتخصص له وتكوين الععد الجذرية عليه (Ulrik et al., 2001) لانجاح العلاقة التعايشية بين بكتريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية، لكونه يؤثر في نشوء خيط الاصابة واستطالته عند غزو الرايزوبيوم للشعيرات الجذرية الفتية للنبات وتكوين الععد الجذرية المثبتة للنتروجين الجوي (Pellpck et al., 2000). و جاءت قابلية العزلات الاربع على انتاج كلوكونات (1-3) β الذي ظهر واضحاً من النقاط مستعمراتها لصبغة Aniline Blue تعمل على زيادة حركة البكتريا (Germia et al., 1987) ثم زيادة فرص ارتباطها بالقمم النامية للشعيرات الجذرية الملقحة بها (Ames & Bergman, 1981) فضلاً عن مقاومة العزلات الاربع للتركيز الملحية (2,1)% في النمو الذي يمكن ان يرجع لانتاج هذه البكتريا لعدد من المركبات التي تقوم بوظيفة الحماية من التأثيرات الازموزية Osmoprotectants، اذ تشير إحدى الدراسات الى تفوق العزلات المحتملة للملوحة في تحفيزها لنشوء الععد الجذرية وتثبيتها للنتروجين الجوي بشكل أفضل من تلك الحساسة للملوحة (Bohcompagni et al., 2003).

وعلى الرغم من وضع كل من جنس الرايزوبيوم مع جنس الاكروبيكتريوم في التصنيف الحديث في عائلة *Rhizbiaceae* وذلك لتشابهها في كثير من الصفات، فأنهما يختلفان قليلاً في عدد من الصفات المزرعية، فمثلاً تحتاج بكتريا الرايزوبيوم الفيتامينات ومنظمات نمو في البيئة، في حين تستطيع الاكروبيكتريوم النمو في بيئة يسيرة تحتوي على امونيا مصدراً وحيداً للكربون بوجود عوامل النمو او غيابها (Chen et al., 1999)، وعدم قدرتها على الفلورة على وسط King media (Young et al., 2001) على العكس من الرايزوبيوم حين الفحص بجهاز UV transilluminator وامتلاك الاولى القدرة على تخمير سكر الميلزيتوز، الا ان الطريقة الاساسية في تمييزها عن بعضها هي قدرة جنس الرايزوبيوم على تكوين العقد الجذرية على جذور النباتات البقولية وعدم قدرة جنس الاكروبيكتريوم على ذلك، وامراضية الاكروبيكتريوم للنبات وتتمثل بتكوينها نموات غير عادية في النباتات يطلق عليها بالاورام التاجية (Zambryski, 1988)، وعجزها عن اختزال النتروجين.

تمت دراسة العلاقة التعايشية المتخصصة بين بكتريا *S.meliloti* ونبات الجب *M.sativa* ومدى تأثير تباين العزلات البكتيرية المعزولة وانعكاساتها على جوانب العلاقة التعايشية باستعمال عزلات مختلفة من الـ *S.meliloti* (Rh4 و Rh3، Rh2، Rh1) المعزولة من الاصناف النباتية الاربعة للجب (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الامريكي) واجراء التلقيح المتبادل لهذه الاصناف باستعمال هذه العزلات، وقد تم التوصل الى انتخاب العزلات العالية الكفاءة في تكوين العقد الجذرية وثبيتها للنتروجين الجوي الذي ظهر واضحاً في تسجيل أعلى معدل لتكوين العقد في السلالة (Rh1) تلتها السلالة (Rh2) ونسب (68، 64)% على التوالي، وتلتها بقية العزلات، و يعود نجاح تحقيق هذه العلاقة بين طرفي العلاقة التعايشية لتبادل طرفي العلاقة التعايشية للدلائل الجزئية التي تتمثل بافراز جذور النبات البقولي للمركبات الفلافونيدية Flavonoids (Wojtaszek et al., 1993) التي تفرزها الشعيرات الجذرية لنباتات الجب لتحث الجينات المتخصصة للمضيف النباتي Host specific nodulation genes على التفسير لانتاج عوامل تكوين العقد Nod factor (Long, 1996) الذي يربط جزءها الكايتيني بشكل متخصص بكتين الجب الذي له دور مهم للارتباط ببكتريا الرايزوبيا بالارتباط بعوامل تكوين العقد المتخصصة مؤدياً الى تشويه الشعيرات الجذرية التي تعد المداخل الرئيسية التي تتخذها بكتريا الرايزوبيوم وذلك بارتباطها بها بنوع من البروتينات التي تفرزها هذه الشعيرات (Paez-valencia et al., 2008; Daneil et al., 2006). لتنتهي بانقسام خلايا القشرة، ولتكوين العقد الجذرية بنسب واشكال متباينة ما بين (المتطاولة والاقرب الى الكروي، والمتفرعة) فضلا عن اختلاف المحتوى البروتيني للعينات باختلاف العزلة المستخدمة في التلقيح

مع تباين الصنف للمضيف النباتي، وذلك لان العلاقة التعايشية تتوقف على عوامل حيوية تتعلق بكل من النبات والبكتريا ومقدار استجابة كل منهما للاخر في اثناء العلاقة المشتركة وربما يعود ذلك الى اختلاف نوع الفلافونيدات المفردة من الشعيرات الجذرية للانماط الوراثية المختلفة للجت كفلافونيد Luteolin و Quercetin و Chrysoeviol لكونها تؤثر في انتاج عوامل تكوين العقد Nod factor من قبل *S. meliloti* (Cardenaus et al., 1995) ولتأثيره المحفز في كونه يعمل عامل جذب كيميائي يزيد من نسبة ارتباط بكتريا الرايزوبيوم بالشعيرات الجذرية لنبات العائل البقولي المتخصص مما يترتب عليه زيادة أعداد العقد المتكونة على هذه النباتات (Long, 1989)، و من ناحية اخرى اشارت إحدى الدراسات (Price et al., 1984) الى ان شكل العقدة لا يعتمد على السلالة البكتيرية وانما على العائل النباتي، وقد كُشف عن وجود جينات *mads-box* في نباتات الجت مسؤولة عن التشفير لبروتينات تعمل على تطوير العقد عند التلقيح بالرايزوبيوم، من ناحية أخرى يمكن تفسير هذه الاختلافات في اشكال العقد المتكونة واعدادها الى وجود درجة عالية من التباين الوراثي في العزلات البكتيرية المعزولة من اصناف مختلفة وترب مختلفة مما ربما يكون له دور في ظهور سلالات ذات انماط وراثية جديدة (Whittam, 1992).

وتشير الدلائل في الانظمة البقولية الى ان البقوليات تميل الى تكوين العقد بتفضيلها احدى السلالات دوناً عن الاخرى علماً ان اختلاف الانماط الوراثية للـ *S. meliloti* المعزولة من الاصناف الاربعة لنباتات الجت قد يعود لاختلاف المناطق الجغرافية المعزولة منها (Paffetti et al., 1998)، ينتج عن تطور التركيب الوراثي تحت تأثير مختلف الظروف البيئية لمواقع العزلات تبادل في مواقع الجينات نتيجة لتغيير التربة او لتغيير النمط الوراثي للمضيف النباتي الذي عزلت منه البكتريا والظروف البيئية المحيطة (Demeza et al., 1995)، وربما يفسر هذا سبب اختلاف اعداد العقد المتكونة في حالات التلقيح المختلفة الواردة في معاملات الدراسة الحالية (Leung et al., 1994) وذلك نتيجة لتوافق النمط الوراثي للسلالة المستعملة مع النمط الوراثي للمضيف النباتي (Bromfield et al., 1986)، فضلاً عن ان الوقت اللازم الذي تستغرقه كل عقدة للنشوء وعدد العقد يتباين باختلاف السلالة المستخدمة (Webster et al., 1995) وقدرتها على تثبيت النتروجين الجوي بالاشتراك مع العائل النباتي، إذ تميزت 25 عزلة من اصل 100 عزلة من البكتريا في قدرتها على تثبيت النتروجين الجوي في صنف واحد من نباتات البرسيم، وكانت 50 عزلة منها ذات قدرة متوسطة على تثبيت النتروجين، في حين تبين ان الباقي ضعيفة على التثبيت، وربما يرجع السبب في هذا الاختلاف الى

السرعة التي تتحلل فيها العقد الجذرية في حالة السلالات غير الفعالة بالمقارنة مع السلالات الفعالة التي تستمر حالة التعقد فيها فترة اطول (النعيم وحسين، 2002).

ويعتمد نجاح العلاقة التعايشية المتخصصة على قابلية عزلة الرايزوبيوم التي تمتلك قدرة محددة في اصابة نمط وراثي معين للمضيف النباتي وتتعرض على مدى التوافق بينهما المتمثل بنجاح الاصابة وتكوين العقد الجذرية وتطورها على المضيف المتخصص (Bhuranewar *et al.*, 1988) وذلك بفعل استساخ جينات Nodulation genes التي يحفزها *nod D genes* و تعمل على اصابة المضيف المتخصص بفعل تنشيط اوبيرونات تكوين العقد *nod operons* بعد الاستجابة لمختلف المكونات المشتقة من المضيف النباتي (Horraath *et al.*, 1987)، ان اعداد العقد المتكونة على بادرات الجت باصنافه الاربعة والتي تباينت مع اختلاف السلالة المستعملة في التلقيح تعد من الامور المهمة في تقييم السلالة الاكفاً مع التراكيب الوراثية للصنف النباتي المستعمل، وان اعتماد النسبة المئوية للعقد المتكونة بفعل كل سلالة يُعد عاملاً رئيسياً في تحديد كفاءة السلالة والذي ينعكس بشكل ايجابي على المجاميع الخضرية والذي ينعكس مستقبلاً على اضعاف صفات ايجابية في النباتات المكونة للعقد من حيث نضارتها واخضرار اجزائها بالمقارنة مع تلك التي تمتلك اقل عدد من العقد او غير المكونة للعقد، إذ اشارت احدى الدراسات الى زيادة الاوزان الجافة والمحتوى البروتيني لنباتات الحمص للعقد، *Chickpea* المكونة للعقد (Fentahun *et al.*, 2013).

ان تبني صفة المقاومة للمضادات الحيوية بنوعها المقاومة او الحساسية بوصفها علائم وراثية دائمة لتشخيص البكتريا المعزولة قيد الدراسة (Marja *et al.*, 2004) يُعد من اهم الاسس التطبيقية في الجانب التشخيصي فضلاً عن اعتمادها الجوانب الامراضية (البايولوجية) والفحوصات الكيموحيوية دلائل مهمة في اثبات حدوث حالة الانتقال الافقي لبلازميدات التعايش *Sym plasmid* وبلازميد الامراضية *Ti-plasmid* بتقانة الاقتران البكتيري بين كل من *A.tumefaciens* المعزولة والمهندسة وراثياً (References strain) بشكل متبادل.

وتظهر البيانات الواردة في نتائج اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية، ان السلوك الذي ابداه الجنسان كلاهما من البكتريا المستعملة قيد الدراسة كان واضحاً من المقاومة التي اظهرتها الاكروبيكتريوم او الرايزوبيوم لمعظم المضادات الحيوية المستعملة مما قد يرجع وعلى وجه التحديد الى عدم تعرضها للضغط الانتخابي الذي تعاني منه العزلات الممرضة للانسان الذي تمتاز بمقاومتها لاغلب المضادات المتوفرة كمقاومة عزلات الرايزوبيوم للـ Chloramphenicol و Streptomycin و Erythromycin وحساسيتها للـ Rifampicin

(Cevheri *et al.*, 2011) وجاءت نتائج مقاومتها (الرايزوبيوم) مطابقة لما اشار اليه Küçük و Cevheri (2012) في مقاومة عزلات الرايزوبيوم المعزولة من البرسيم للـ Ampicillin و Streptomycin و Chloramphenicol أو على العكس من ذلك فقد يكون سبب مقاومتها نتيجة لتعرضها لهذه المضادات في التربة ولكونها من الانواع وخاصة جنس (*Rhizobium*) المكونة لميكروفلورا الرايزوسفير الذي يعطيها صفة المقاومة (الحسو والطائي، 2008). ولتكيفها في العيش بوجود الكثير من المواد الموجودة في التربة والتي تنتجها الاحياء المجهرية الاخرى المتواجدة معها كالفطريات والاكثينومايسينات التي تتميز بانتاجها للمضادات الحيوية، مما دفع هذه البكتريا الى تطوير اليات ذاتية متخصصة لمقاومة المضادات الحيوية وذلك لضمان بقائها واستمرارها (Cho *et al.*, 2009). كما ان المقاومة التي ابدتها هذه البكتريا بجنسها للامبيسلين يُعزى الى انتاجها لانزيمات β -Lactmases المحللة لهذا المضاد الحيوي من كسر حلقة β -Lactams المكونة له (Brody *et al.*, 1994)، وجاءت نتائج مقاومة الرايزوبيوم للـ Streptomycin و Amoxicillin و Chloramphenicol و Ampicillin و Tetracycline مطابقة لما اشارت اليه عدة دراسات في امتلاك هذا الجنس من البكتريا صفة المقاومة لهذه المضادات الحيوية في عدد من العزلات العائدة لبكتريا *S.meliloti* و *Rhizobium leguminosarum* (الزيدي، 2005 ; Belachew, 2010) التي يرجع تفسير مقاومتها الى تثبيط هذه البكتريا عملية ايفاف تصنيع البروتين الذي تحفزه هذه المضادات داخل الخلية البكتيرية (Talaro & Talaro., 1996).

وأفادت احدى الدراسات الى ان امتلاك بكتريا الـ *A.tumefaciens* لصفة المقاومة للـ Rifampicin و Gentamycin و Tetracycline يرجع الى وجود جينات مقاومة لهذه المضادات في الذخيرة الوراثية لهذه البكتريا (Hellens *et al.*,2000)، في حين تفسر حساسيتها للـ Kanamycin, Chloramphenicol و Tetracyclin الى فعالية هذه المضادات في تثبيط نمو البكتريا من منعها تصنيع البروتين وتكوين الغشاء الخلوي (Shishido & Pepper,1990)، إذ برهنت احدى الدراسات بان مجموعة الـ Chloramphenicol , و Gentamycin و Tetracycline تعمل على منع تصنيع البروتين حين ارتباطها بالرايزوبيوم الذي ينعكس على فشل عملية الترجمة Translation للمRNA خلال مراحل تصنيع البروتين في الخلية البكتيرية (Yassin *et al.*, 2005).

ويجدر القول ومن المقارنة بين نتائج الدراسة الحالية مع ما اشارت اليه البحوث ان هناك صفة مشتركة نوعاً ما بين عزلات الرايزوبيوم الاربع قيد الدراسة مع تلك التي اشار اليها الباحثون اعلاه الا وهي مقاومتها المشتركة لعدد من المضادات الحيوية كـ Ampicillin و

Amoxicillin و Chloramphenicol و Erthromycin و Trimthprim المستعملة في هذه الدراسة، ومن المعروف ان الخلايا البكتيرية يمكن ان تفقد بلازميداتها تلقائياً ولكن بترددات واطئة ويطلق على مثل هذه الظاهرة التحييد التلقائي Spontaneous curing، ويفسر ذلك انخفاض مستوى التحييد التلقائي في عينات الدراسة والذي يتراوح ما بين (1-15)%، وظهرت البيانات التي حصل عليها ان العزلات ابدت نسب متباينة للتحييد التلقائي لعدد من المضادات الحيوية وكانت العزلات قد ابدت أعلى نسباً للتحييد للمضاد الحيوي Str وأدناها للـ Amoxicillin وربما يعود تفسير هذه النتائج الى ان هناك خلافاً ما في آلية توزيع نسخ الـ DNA البلازميدي في الخلية البكتيرية الام اثناء عملية الانقسام الخلوي مما يؤدي الى توليد خلايا بكتيرية غير حاوية على نسخ من الـ DNA البلازميدي الذي يمنح صفة المقاومة للمضادات الحيوية فضلاً عن أن لعدد نسخ الـ DNA البلازميدي Copy Numbers في الخلية الجرثومية الام عاملاً مهماً أيضاً ويؤثر في آلية التوزيع في اثناء الانقسام الخلوي وهي من الصفات الخاصة بالبكتريا التابعة لعائلة Rhizobiaceae التي تتميز البكتريا فيها بامتلاكها عدد قليل من نسخ الـ DNA البلازميدي (Valerie & Sharon, 1999)، وبالامكان زيادة تردد فقدان البلازميدات بتعريض الخلايا الى مركبات تحشر نفسها بين قواعد الـ DNA وبشكل خاص باستعمال الاكريدينات مثل Ethidium Bromide و Acridine orange او بأستعمال مواد اقل خطورة Sodium dodecyl sulphate (Mickelsen et al., 1985)، والتي ينتج عنها خلايا خالية من البلازميد ثم سيثبط نموها بوجود المضادات الحيوية (Dale and Park., 2004)، أجرى تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي للعزلات قيد الدراسة باستعمال الاكريدين البرتقالي بوصفها عاملاً محييداً وذلك لغرض الكشف عن مواقع المورثات الخاصة بمقاومة المضادات الحيوية، وبرهنت النتائج على وقوع الجينات المسؤولة عن صفة العلاقة التعايشية والامراضية في *S. meliloti* والـ *A. tumefaciens* على بلازميداتهما بدليل اختفاء قدرة بكتريا الرايزوبيوم على تكوين العقد الجذرية، والاكروبيكتريوم على تكوين الاورام التاجية في البكتريا المحيدة بالمقارنة مع عينات المقارنة (غير المحيدة) لكلا الجنسين قيد الدراسة.

وأظهرت نتائج هذه الدراسة القدرة العالية في تحييد صفة المقاومة في كل من الرايزوبيوم والاكروبيكتريوم باستعمال عامل التحييد الاكريدين البرتقالي، وظهرت كفاءته في التحييد حين إستعمال نصف التركيز القاتل للبكتريا وهو (500) مايكروغرام/ مل و (50) مايكروغرام/مل لتحييد صفة المقاومة في كل من الاكروبيكتريوم والرايزوبيوم على التعاقب، إذ برهنت النتائج ان أعلى نسبة للتحييد كانت للمضاد الحيوي Rif وأدناها للـ Erthromycin وأن أعلى نسبة لتحييد في *S. meliloti* كانت للمضاد الحيوي Chloramphenicol بلغت (80)% وأعلى نسبة تحييد

في الاكروبيكتريوم للمضاد الحيوي Rifampicin (78%) مما يؤكد وقوع الجينات المسؤولة عن اظهار صفة المقاومة للمضادات الحيوية المحيدة على DNA البلازميدي، وعلى العكس من ذلك أظهرت النتائج وقوع جينات صفة المقاومة للـ Cefotaxime في *S.meliloti* و Trimthprim في الاكروبيكتريوم بنوعها البرية والمهندسة وراثياً على الكروموسوم بدلالة عدم امكانيته تحييد صفة المقاومة لهذه المضادات باستعمال المحييد الكيميائي الذي برهن نجاحه في تحييد صفة المقاومة للمضادات الحياتية الاخرى تجاه عزلات البكتريا قيد الدراسة.

وجاءت نتائج الكفاءة العالية للاكردين البرتقالي على التحييد مطابقة لما توصلت اليه احدى الدراسات ، التي اشارت الى كفاءة كل من الاكردين البرتقالي و SDS في تحييد محتوى DNA البلازميدي لعامل الخصوبة F⁺ في بكتريا *E.coli*^{k12}، وتأثيره في الحد من تكاثر وتضخيم البلازميد (Hohn & Korn, 1969)، ويلجأ استعمالها لهذه المادة على وجه التحديد لغرض التحييد لنجاح استعمالها في تحييد المحتوى البلازميدي للعديد من السلالات البرية wild-type، إذ افاد عدد من الدراسات الى نجاح استعمال المحييد (الاكردين البرتقالي) في تحييد المحتوى البلازميدي للـ *A.rhizogenes* R1601 (السلمان، 2008) بدلالة فقدان البكتريا لصفة المقاومة للمضادين الحيويين Kanamycin و Carbencillin عند استعمال التركيز نفسه (500) مايكروغرام/مل، وذكرت احدى الدراسات (Rasool et al., 2003) كفاءة استعماله محيداً لازالة بلازميدات المقاومة للمضاد الحيوي في عزلات *Klebsiella spp*، إذ اظهرت العزلات الجرثومية المدروسة اختلافاً في نسب ازالة المقاومة لعدد من المضادات الحيوية التي تناولتها الدراسة المارة والمحمولة على بلازميد R-Plasmid فضلاً عن فعالية هذا المحييد في ازالة عامل الخصوبة F-Plasmid المسؤولة عن الاقتران البكتيري، إذ اظهرت النتائج التطابق في حصول التحييد في الصفات المظهرية دعماً للصفات الوراثية، إذ لم تظهر البكتريا المحيدة سواء كان الاكروبيكتريم ام الرايزوبيوم أي قدرة على تكوين الاورام التاجية او العقد الجذرية على التوالي، وجاء استعمال البكتريا المحيدة في الجنسين بوصفها خلية مستلمة في حالتها الاقتران المتبادل لتسهيل عملية الاقتران بينهما لاستقبال بلازميد الاخرى.

وجاءت نتائج ترحيل DNA البلازميدي المعزول لعينات الدراسة على هلام الاكاروز لتؤكد وبما لا يقبل الشك نجاح عمليات التحييد للبكتريا *A.tumefaciens* و *S.meliloti* باستعمال الاكردين البرتقالي من فقدان العزلات المحيدة لبلازميداتا بدلالة عدم ظهور حزم للـ DNA البلازميدي على هلام الاكاروز بالمقارنة مع العزلات غير المحيدة، و بينت هذه النتيجة ان عملية التحييد تعمل على ازالة DNA البلازميدي الحاوي على معظم جينات المقاومة للمضادات الحيوية، وكذلك الجينات المكونة للعقد وتثبيت النتروجين بالنسبة للـ *S.meliloti*

وجينات الامراضية وتكوين الاورام التاجية في بكتريا *A.tumefaciens* وهي من الدلائل المظهرية التي دعمت بشكل واضح حصول حالة التحديد، وربما يرجع الى قدرة هذا المركب وغيره من المركبات المحيدة كـ Nitroacridines و Aminoacridines واملاح Ethidium على الاندساس داخل DNA (Hahn, 1976)، إذ تحوي هذه المركبات حلقات كارهة للماء معقدة تستطيع ان تحشر بين القواعد النتروجينية في DNA ثنائي الخيط للخلية البكتيرية وتتداخل مع مختلف الفعاليات الحيوية كالتضاعف والاستساخ والترجمة وإعادة التشكيل RNA و Recombination , splicing , واحداث طفرات الازاحة (Lee et al.,1996) واحداث طفرات خاصة في مواقع تضاعف البلازميدات مما يتسبب في ازالة هذه البلازميدات، إذ اظهر هذا المطفر قابلية عالية في تطهير مختلف عزلات الرايزوبيوم المعزولة من مختلف النباتات البقولية كالعزلات المعزولة من *Pisum sativum* و *Lens culinans* و *Sesbania aculeate* و *Vigna mungo* و *Phaseolus vulgaris* التي فقدت مقاومتها لمختلف المضادات الحيوية كـ Streptomycin و Amoxicilling و Ampicillin بعد تحييد بلازميداتها (Naher et al., 2012).

تم الاستدلال في اثبات حصول حالة الانتقال الاقفي المتبادل للبلازميدات بعملية الاقتران في كل من الاكروبيكتريوم المعزولة و المهندسة وراثيا و *S.meliloti* بالاعتماد على الدلائل الوراثية و المظهرية الواضحة. إذ اعتمدت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية فقد تبين مقاومة بكتريا *S.meliloti* لعدد من المضادات الحياتية و منها Chloramphenicol و Cefotaxime و حساسيتها لعدد من المضادات الحياتية كـ Trimthprim و Rifampicin في حين اظهرت نتائج اختبارات الحساسية مقاومة الاكروبيكتريوم لبعض المضادات الحيوية الريفامبسين Rifampicin و Trimthprim وحساسيتها لا Chloramphenicol و Cefotaxime وبعد اجراء عملية الاقتران البكتيري تبين مقاومة بكتريا Transconjugant *Agrobactrium* المعزولة والمهندسة للـ Chloramphenicol حين تنميتها على الوسط الغذائي المدعم بالمضادين الحيويين Chloramphenicol, Tri, ومقاومة بكتريا Transconjugant *Sinorhizobium* (1,2) للـ Rifampicin حين تنميتها على الوسط الغذائي المدعم بالـ Rifampicin، وهذه دلالة واضحة على احتمالية انتقال الجينات المشفرة لصفة المقاومة للمضاد الحيوي Chloramphenicol الواقعة على DNA البلازميدي R-Plasmid من بلازميد *S.meliloti* الى *A.tumefaciens* عبر جسر الاقتران المتكون بين الخليتين وتضاعفه بعملية Rolling-circle replication (Talaro and Talaro, 1996) وانتقال الجينات المشفرة لصفة المقاومة للمضاد الحيوي Rifampicin الواقعة على DNA البلازميد للـ

A.tumefaciens عبر جسر الاقتران المتكون بين الخليتين و تضاعفه بالالية نفسها ويُعد ظهور المقاومة للمضادين اعلاه من المقترنات مؤشراً ايجابياً يستدل منه على انتقالهما بعملية الاقتران من الخلية الواهبة *S.meliloti* الى الاكروبيكتريوم (كخلايا مستلمة) وعلى العكس من ذلك من الاكروبيكتريوم الى الرايزوبيوم كما اشار اليه (Hellens et al., 2000).

وافاد العديد من الدراسات نجاح انتقال DNA البلازميدي بدلالة تردد الاقتران بين الانواع المختلفة في جنس الرايزوبيوم او بين الاجناس التابعة لعائلة Rhizobaceae السالبة لصبغة كرام او مع الانواع التابعة لعائلة Enterobacteriaceae وسجلت البيانات الاولية المتحققة في هذه الدراسة تردد الاقتران لبكتريا *S.meliloti* مع *A.tumefaciens* (AtMco1) ($10^{-2} \times 1.8$) ومع *A.tumefaciens* ($10^{-2} \times 2.1$) في حين اشارت الدراسات الى انخفاض تردد الاقتران الى ($10^{-6} \times 2$) بين الانواع المختلفة في بكتريا الرايزوبيوم العائدة لعائلة Rhizobaceae والى (10^{-1}) بين السلالات المختلفة لـ *R.meliloti* وبكتريا *E.coli* بلازميد PRK2 الحامل للجينات المشفرة لصفة المقاومة للنتراسايكلين باستعمال الكوزميد KR2 Cosmid ناقلاً للبلازميد لامتلاكه للبروتين (mob) في الموقع المتخصص (ort) origin of transfer والواقع بجانب جينات *tra genes* (Herrer-Cerrera et al., 1998;1996) في حين بلغت قيم تردد الاقتران بين *A.tumefaciens* (AtMco1) و *S.meliloti* ($10^{-3} \times 1.9$) وبين *A.tumefaciens* و *S.meliloti* ($10^{-3} \times 1.6$) وربما يرجع هذا التباين نسبياً الى اختلاف استجابة العزلة البرية عن المهندسة وراثياً لعمليات الاقتران.

وعلى الرغم من سلبية امتلاك كل من *S.meliloti* و الاكروبيكتريوم للبلازميدات الكبيرة megaplasmid في احداث عملية الاقتران للبكتريا ، اذ يتراوح حجمها في *S.meliloti* ما بين (1400_1600)kbp (Guo et al., 2003) وفي الاكروبيكتريوم (Mysor et al., 200kbp) (2000) فأن ظهور مثل هذه القيم في ترددات الاقتران ربما يرجع الى مقاومة هذه البلازميدات لعمل انزيمات القطع الخارجي في البكتريا المستقبلية لعدم احتوائها على النهايات الحرة الموجودة في جزيئات الـ DNA الخطية (معارج، 1999) اذ تمكنت الدراسة الحالية من نقل بلازميدات الضراوة T-Plasmid بعملية الاقتران من البرية و المهندسة وراثياً الى *S.meliloti* وتمكنت الاخيرة (Transcojugant Sinorhizobium) من تكوين الاورام التاجية على سيقان البادرات المحقونة و تكوين التراكيب الشبيهة بالاورام Tumor-like structures على جذور بادرات الجت وتُعد هذه الاستجابة من النتائج البارزة في هذه الدراسة و يفسر حدوثها بانتقال بلازميدات Ti الى *S.meliloti*، ويعد تكوين الاورام على السيقان تحت الفقية للبادرات المحقونة و التراكيب الشبيهة بالاورام على الجذور من اهم المؤشرات على نجاح انتقال

بلازميد Ti، ومن ناحية اخرى تفسر زيادة المحتوى البروتيني للبادرات الملقحة بالبكتريا Transcojugant Sinorhizobium (المقترنة) الى اكتساب بكتريا الـ *S.meliloti* لبلازميدات Ti الحامل لقطعة الـ T-DNA و الجينات المسؤولة عن تشفير الاحماض الامينية غير الاعتيادية بعد انتقالها من بلازميد Ti الى المادة الوراثية لبادرات الجت بفعل البكتريا المقترنة التي ينتج عنها تكوين الاورام الشبيهة بالعقد على الجذور علما ان بلازميد *A.tumefaciens* (C58CI) يحتوي على الجينات المشفرة للاوبينات (Nopaline) الذي سوف يشفره النبات المحول وراثيا (Michael&Klans.,1988) وسينعكس تأثيره بشكل غير مباشر على زيادة المحتوى البروتيني للبادرات الملقحة بالبكتريا المقترنة الحاملة للبلازميد Ti.

واكد عدد من الدراسات نجاح عمليات النقل المبرمجة و غير المبرمجة لجينات معينة ما بين بكتريا *Rhizobium* و *Agrobactrium* بعملية الاقتران (Park,1996) اذ تمكن الباحث ياسين (2011) من اجراء الاقتران بين *S.meliloti* و *A.tumefaciens* وتميزت البكتريا الناتجة من الاقتران بقدرتها على تكوين الاورام التاجية على البادرات الملقحة في منطقة التاج. وقد اشارت احدى الدراسات الى نجاح انتقال بلازميد Ti من سلالة الى اخرى بدلالة الحصول على 20 مستعمرة مقترنة حاملة لبلازميد المقاومة R 68.45 القابل للانتقال و الحركة من السلالة 15955 الى الخلية المستلمة (Hanmadag et al., 1979) ونقل بلازميد الضراوة و اكساب الامراضية الى *E.coli* ذو السلالة 1-517 بطريقة الاقتران مما دفع الى توسيع المدى العائلي للمضيف النباتي و قدرتها على تصنيع النوبالين في الانسجة النباتية الملقحة فيها (Kazuy et al.,2009) وذكرت احدى الدراسات امكانية نقل Ti plasmid بين سلالتين مختلفتين من *A.tumefaciens* و بينت الدراسة دور بروتينات virB في احداث هذا الاقتران و نقل البلازميد نفسه بتقانة الاقتران الى سلالة اخرى من الاكروبيكتريوم (Michael & Klans,1988) والى الرايزوبيوم (Hooykaas et al.,1977) وجعل البكتريا الناتجة من الاقتران قادرة على تكوين الاورام على النباتات، و اشارت احدى الدراسات الى تحول نمط احد انواع الاكروبيكتريوم غير الممرض *A.radiobacter* الى ممرضة بعد اجراء الاقتران بشكل طبيعي مع *A.tumefaciens*، اذ اظهرت الاولى القابلية على تكوين المرض نتيجة لاكتسابها Ti Plasmid (Levin.,1976).

ان انتقال البلازميدات التابعة لجنسين قيد الدراسة وبشكل متعاكس حين اجراء عملية الاقتران بعد معاملة الخلايا بالاكردين البرتقالي، وربما يشير الى قابلية هذه البلازميدات (Ti,pSym) على الحركة والانتقال من الخلايا الواهبة الى الخلايا المستلمة، وهذا ما اثبتته نتائج الترحيل لعينات الـ DNA البلازميدي على هلام الاكاروز، التي اظهرت تباينا واضحا في

الاوران الجزيئية بحزم البلازميدات في البكتريا المستلمة و الواهبة ،مع تطابق الاوزان الجزيئية لحزم البلازميدات في كل من البكتريا الواهبة و الناتجة من الاقتران في الحالتين كليهما .
وافرزت نتائج الترحيل على هلام الاكاروز امتلاك العزلة البرية من الاكروبيكتريوم على بلازميد واحد و امتلاك السلالة القياسية منها على بلازميدين ، وجاءت هذه النتائج مطابقة لما اشارت اليه احدى الدراسات (Rosenbery et al., 1983) من انفصال حزمتين من البلازميد على هلام الاكاروز لل DNA البلازميدي المعزول من السلالة *A.tumefaciens* (C58C1) قدر الوزن الجزيئي للعليا $10^6 \times 273$ دالتون والسفلى $10^6 \times 130$ دالتون. في حين اشارت الدراسة التي اجراها Al-kanaanny واخرون(2012) الى انفصال حزم DNA البلازميدي لعزلات *S.meliloti* وهي من النوع ميكابلازميد التي تراوحت اوزانها الجزيئية ما بين kbp (1.400-1.600)، في حين تراوحت الاوزان الجزيئية لحزم DNA البلازميدي المعزول من قبل عزلات اخرى للـ *S.meliloti* ما بين (1.400-1.700) kbp لبلازميدي Sym و Sym A على التوالي (Hynes et al.,1986).

وتشير الدراسات الى ان اغلب الجينات المتعلقة بالتعايش التي تقع على البلازميدات يمكن اكتسابها افقيا (Hooykaas et al .,1981) نتيجة لامتلاك هذه البلازميدات القدرة على الحركة والانتقال من الخلايا الواهبة الى الخلايا المستلمة وان كانت هذه البلازميدات لاتمتلك هذه الصفة فربما هناك عناصر ناقلة او بلازميدات بحجم اصغر من الميكابلازميد تقتحم هذه البلازميدات تكون هي المسؤولة عن الحركة والانتقال نتيجة للتركيب الجديد للبلازميد الذي يمتلك القابلية على الحركة واعطاء صفات جديدة للخلايا المستلمة بوصفها صفة المقاومة للمضادات الحيوية اوصفة تكوين الاورام التاجية (Hynes et al.,1986) او قد تحتوي السلالة على بلازميد له القدرة على الحركة والانتقال كامتلاك احدى سلالات *A.tumefaciens* على بلازميد R68.45 Plasmid Incp1 القادر على نقل الجينات الكروموسومية من بكتريا *A.tumefaciens* الى بكتريا اخرى واظهار عدد من الصفات الامراضية فيه حين اصابة النباتات (Hanmadag et al.,1979) واوضح الباحث (Levin et al.,1976) ان عوامل المقاومة للمضادات الحيوية يمكن ان تنتقل بين سلالات *A.tumefaciens* المختلفة بالاقتران، اذ لوحظ انتقال عوامل R ما بين مختلف العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام وبضمنها *A.tumefaciens* ، فضلا عن انتقال هذه العوامل ما بين سلالات *Rhizobium leguminosarum* (Beringer & Hopwood .,1976).

ان الدلائل الوراثية والمظهرية التي تطرقنا اليها سابقا و التي تتمثل في انشاء العلاقة التعايشية المتخصصة القائمة على مبدأ تحفيز المركبات الفلافونيدية المنتجة من الشعيرات الجذرية للنبات البقولي بكتريا الرايزوبيوم على انتاج عوامل تكوين العقد Lipo- oligosacchoride و Fraysse *et al.* (2005) انتاج عوامل تكوين العقد Nod factros (Xi- Wan *et al.*,2007; Valerie & Sharon.,1999) وتشفر جزءاً منها من قبل الجينات المكونة للعقد المتخصصة بالمضيف Hostspecifcity nodulation ، شجعت على التفكير بإمكانية اقامة علاقة تعايشية بين الخلايا الناتجة من الاقتران Transconjugant Agrobacterium (C58C1), Transconjugant Agrobacterium (AtMco1) مع نباتات الجت، التي نتج عنها تشويه الشعيرات الجذرية وتكوين عقد جذرية مشابهة للعقد المتكونة في العلاقة التعايشية المتخصصة بين الجت و *S.meliloti* و مثبتة للنيتروجين بدلالة زيادة المحتوى البروتيني للمجموع الخضري للبادرات الملقحة . ويفسر هذا التكوين للعقد على نجاح عملية الاقتران في هذا الجانب في نقل بلازميد pSymA الجينات المسؤولة عن تكوين العقد *nod genes* وتثبيت النتروجين الجوي *nif genes* ، بها و بلازميد pSym B الحامل للجينات العنقودية التي تشفر لبناء عديد السكريات الخارجي Exopolysaccharide (Dominguez- Ferreras *et al.*,2006; Ann *et al.*,1985) اذ ان انتقال مجموعة الجينات المكونة للعقد *nod genes* من *S.meliloti* الى *A.tumefaciens* و يبرهن ظهور هذه العقد نجاح عملية الانتقال الاقوي لهذه الجينات بتقانة الاقتران، وجاءت هذه النتائج مطابقة لما اشارت اليه احدى الدراسات (Wong *et al.* ,1983) في نجاح التعبير في كل من البكتريا الواهبة *S.meliloti* والبكتريا المقترنة Transconjugant Agrobacterium في تكوين خيط الاصابة Infection threads تكوين العقد على بادرات الجت الملقحة بها.

وكما هو معروف تُعد الاكروبيكتريوم من اهم النواقل الكفوءة لنقل الجينات المحمولة على بلازميداتنا الى الخلايا النباتية او من تحويل هذه البلازميدات و ادخال صفات مختلفة عليها، فقد ذكرت احدى الدراسات امكانية نقل بلازميد التعايش لبكتريا *Rhizobium leguminosarumum bv.trifolii* الى خلايا بكتريا *A.tumefaciens*، و نجاح تكوين العقد على جذور البرسيم باستعمال البكتريا المقترنة (Hiroki *et al.* ,2008)، و اشارت دراسة اخرى الى ان بكتريا *S.meliloti* المكونة للعقد الجذرية على نبات الجت قادرة على تحويل بلازميداتنا التعايشية Sym-plasmid الى النوع *Rhizobium leguminosarum bv.trifolii* غير المعروفة بتكوين العقد على هذا النبات والى بكتريا *A.tumefaciens* والحصول على المقترنات التي تحوي جينات التعايش وتمتلك القابلية على تكوين العقد الجذرية المثبتة للنيتروجين على

جذور هذا النبات (Ann et al., 1985) وذكر انه بالامكان تغيير تخصص السلالة لمضيفها النباتي بنقل البلازميدات التعايشية من سلالة رايزوبيوم الى اخرى . و تمكنت دراسة اخرى من نقل الجينات المسؤولة عن تكوين العقد (nod genes) و تثبيت النتروجين (nif genes) بطريقة الاقتران من بكتريا *R.trifolii* الى الاكروبيكتريوم (Hooykaas et al., 1981) او من *S.meliloti* الى انواع اخرى من الرايزوبيوم (Kondorosi et al., 1982) وهذا ما اتفق مع نتائج هذه الدراسة وتجسد في قدرة البكتريا *A.tumefaciens* المقترنة بنوعها البرية و المهندسة وراثيا على تكوين العقد الجذرية على جذور نباتات الجت مشابهة للعقد المتكونة باستعمال *S.meliloti* على عائلها المتخصص ويعزا الى نجاح انتقال البلازميد التعايشي -Sym- plasmid من بكتريا *S.meliloti* الى *A.tumefaciens* بعد تحييد بلازميداتهما، وقد يفسر ذلك بوجود نوعين من المستقبلات على سطوح خلايا الشعيرات الجذرية لنباتات الجت، تتخصص الاولى في الارتباط بـ *S.meliloti* في حين يسمح النوع الثاني منها للارتباط بصورة غير متخصصة مع الانواع الاخرى من الرايزوبيوم (Bono et al., 1996) وربما يفسر هذا ارتباط البكتريا الناتجة من الاقتران بخلايا الشعيرات الجذرية لنباتات الجت ، لكون هذه البكتريا هي احدى هذه الاجناس التابعة لعائلة Rhizobiaceae وان امكانية تكوين العقد فيها امراً وارداً جداً ونجاحها يدعم هذه النظرية و يؤكد حدوثها في هذه الدراسة . ولا يفسر هذا وجود جينات *nod genes* المحمولة على البلازميد التعايشي في الاكروبيكتريوم المقترنة فحسب وانما يفسر امكانية تعبير هذه الجينات في بكتريا اخرى غير *S.meliloti* (Kondorosi et al., 1982) من جانب اخر تمكنت الزبيدي (2005) من اقامة علاقة تعايشية بين بادرات الجت *M.sativa* والبكتريا غير المتخصصة الناتجة من عمليتي الاقتران و التحول الوراثي بين البكتريا المتخصصة *S.meliloti* بوصفها خلايا واهبة و البكتريا *E.coli* بوصفها خلايا مستلمة، و اثبتت الدلائل الوراثية و المظهرية و النسيجية نجاح هذه العلاقة بشكل واضح .

وتمكن (السلمان، 2008) من نقل بلازميد التعايش من *S.meliloti* الى بكتريا *A.rhizogenes* واطهرت نجاح انتقال مجموعة الجينات المسؤولة عن تشويه الشعيرات الجذرية و تكوين العقد المثبتة للنيتروجين ، و اشارت احدى الدراسات (Wong et al., 1983) الى تكوين التراكيب الشبيهة بالعقد Nodule like structure على جذور نباتات الجت الملقحة بالبكتريا Transconjuant Agrobacterium الناتجة من الاقتران ما بين *A.tumefaciens* مع *S.meliloti* واكدت الدراسة ايضا ان هذه التراكيب تتكون من الخلايا المرستيمية الخالية من البكتريا وان البكتريا توجد فقط في خيط الاصابة للشعيرات الجذرية في المنطقة ما بين المسافات البينية للخلايا، وأن العقد المتكونة كانت غير مثبتة للنتروجين وان البكتريا التي انتقلت من خيط

الإصابة إلى خلايا المضيف ليس لها القدرة على التضاعف و لا تتجح في التطور إلى شكل البكتريود Bacteriod. وأشارت الدراسة التي أجراها (Hirsch et al.,1992) إلى تكون نتوءات شبيهة بالعقد Noule like protrusion على جذور بادرات البرسيم *Trifolium repens* الملقحة ببكتريا *A. tumefaciens* المقترنة الحاملة لبلازميد Ti و المكتسبة لجينات تكوين العقد بعد الاقتران مع *S.meliloti* وتكوين تراكيب من الناحية التشريحية مشابهة للتركيب الداخلي للجذر منه إلى العقدة على جذور بادرات الجت الملقحة ببكتريا *A.tumefaciens* أو *R.trifolii* الحاملة في بلازميداتهما لقطع صغيرة من الجينات المكونة للعقد العائدة إلى بكتريا *S.meliloti* (Hirsch et al .,1985).

ومن ابرز ما اثبتته هذه الدراسة هي امكانية تشجيع كفاءة العلاقة التعايشية بين *S.meliloti* و عائلها البقولي المتخصص *M.sativa* وتجسد هذا التشجيع في زيادة اعداد العقد المثبتة للنتروجين الجوي N_2 على جذور بادرات الجت من انتخاب العزلة البكتيرية الاكثر كفاءة في تكوين العقد الجذرية وتثبيتها للنتروجين الجوي، وفضلا عما ذكر فقد حققت هذه الدراسة قفزة واضحة في نجاح انتقال مجموعة الجينات المسؤولة عن تشوه الشعيرات الجذرية *Hac-gens* التي تعمل مع الجينات المكونة للعقد *nod genes* و الجينات المسؤولة على تثبيت النتروجين *fix genes* المسؤولة عن انتاج مجموعة *Heam* المكونة لجزيئات *Leghaemoglobin* عن طريقة الانتقال الافقي لبلازميد التعايش *Sym-plasmid* و بطريقة الاقتران من *S.meliloti* إلى *A.tumefaciens* الفاقدة لهذه الخاصية ، و نجاح الاخيرة على تكوين العقد و تثبيت النتروجين على نبات الجت، بشكل مناظر و بالالية نفسها نجحت الدراسة الحالية في نقل بلازميدات الامراضية *Ti-plasmid* والحامل لجينات الـ *T-DNA* إلى *S.meliloti* ونجاح الاخيرة على تكوين الاورام التاجية على السيقان تحت الفقية والتراكيب الشبيهة بالاورام على الجذور الملقحة بهذه البكتريا المقترنة.

قُدّر تركيز الـ *DNA* البلازميدي المعزول من المقترنات و مقارنته مع تركيز *DNA* البلازميدي المعزول من بكتريا *S.meliloti* و *A.tumefaciens* المعزولة و المهندسة وراثيا والمشفاة ، و كما اشرنا فقد ارتفع تركيز الـ *DNA* البلازميدي المعزول من البكتريا المقترنة بالمقارنة مع البكتريا المستلمة ،وقد يعود السبب إلى اكتساب البكتريا المقترنة للاحماض النووية من البكتريا الواهبة في عملية الاقتران، وجاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه (الشكري، 2013) في ارتفاع تركيز محتوى الـ *DNA* البلازميدي في البكتريا (JM83 و DH5 α و ATCC8739) الناتجة من الاقتران السلالات المستلمة *E.coli* مع بكتريا الرايزوبيوم بانواعها المختلفة، إذ اشار إلى تراوح معدل الزيادة في تراكيز الـ *DNA* البلازميدي في البكتريا المقترنة

ما بين 8.52 الى 124.54 مايكروغرام/مل واكد أن اعلى معدل لقيم تراكيز الاحماض النووية كان في البكتريا المقترنة الناتجة من اقتران الرايزوبيوم المعزولة من نبات الحلبة مع السلالة المختبرية DH5 α .

في حين يفسر تسجيل انخفاض في معدل محتوى الـDNA البلازميدي في العينات المعاملة بالاكتردين البرتقالي الى نجاح عملية التحييد بدلالة الانخفاض الواضح في تركيز محتواها من الـDNA البلازميدي.

والياً تبذل جهود كبيرة لعزل العزلات البكتيرية وتوصيفها بحسب الصفات المظهرية بالاعتماد على المراجع العلمية. وقد أثبتت الابحاث الحديثة ان التعريف على مستوى السلالات للكثير من الكائنات الميكروبية على اساس الفروقات الشكلية قد يشوبها بعض القصور اذ قد يؤدي التشابه الكبير بين الكثير من الكائنات الى نتائج مخطوءة، فضلاً عن ان الكثير من السلالات المعروفة والمستعملة في عدد من المجالات البيولوجية قد يشوبها تغيير في عدد من صفاتها الوراثية بشكل مستمر مما يجعل استمرار استعمالها عديم الجدوى فضلاً عن ان عملية التعرف على هذه التغييرات ومتابعتها غاية في الصعوبة بسبب ظروف النمو غير القياسية في الاوساط الصناعية (Al-kahtani,2008).

لذا تعدّ عملية تمييز التنوع الوراثي وتقييمها هدفاً رئيسياً لتوصيف السلالات الميكروبية، إذ اثبتت الابحاث الحديثة ان تعريف الكثير من الكائنات الدقيقة وتقييمها القائم على اساس الفروق الفسيولوجية او الشكلية قد يشوبها بعض التقصير ولا يعطي تعريفاً دقيقاً، فقد ظهرت حديثاً العديد من التقانات المعتمدة على استعمال الحمض النووي الـDNA لعمل البصمة الوراثية ودراسة التنوع الوراثي للكائنات، واطهرت هذه التقانات قدرات عالية على التمييز بين الكائنات الدقيقة حتى مستوى السلالات، ومن اشهر هذه التقانات تقانة PCR باستعمال التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction اذ تعد هذه التقانة الاكثر شيوعاً الان وتعطي نتائج دقيقة وسريعة وتعتمد هذه الطريقة على استعمال بادئين كل منهما مكون من سلسلة فردية من الـDNA ويتحد هذان البادئان عند مواقع معينة داخل الجينوم ويقوم انزيم البلمرة باكثر المناطق الواقعة بين التحام البادئان وتضخيمهما واطهار نتائجها عند الترحيل على هلام الاكاروز، وظهر ذلك واضحاً من نتائج الترحيل لنواتج تضخيم الـDNA البلازميدي لعينات الاكروبيكتريوم المضخم باعتماد البوادئ المتخصصة للكشف عن *rol-B* بتقانة التفاعل التسلسلي المبلر المتدرج الحرارة Gradient PCR بتولد حزم منفردة واضحة عند الوزن الجزيئي 900 زوج قاعدي في اثناء الترحيل ضمن هلام الاكاروز. وجاءت هذه النتائج لتؤكد بما لا يقبل الشك أن البكتريا المعزولة هي *A.tumefaciens* احدى النواقل البيولوجية المهمة والمسببة لمرض

الاورام التاجية على النباتات وجاءت النتائج الحالية متوافقة مع نتائج عدد من الباحثين حول العالم في هذا الحقل، إذ تمكن عدد من الباحثين *Sobiczewski و Pulawska* (2004) من تشخيص العديد من عزلات *A.tumefaciens* ببوادئ متخصصة لتضخيم الجين *tms gene*. في حين استعملت دراسة أخرى (Larry et al., 2004) بوادئ متخصصة لتضخيم الجينات (Vir D2, Vir F) المشفرة للاوكسينات *iaam,iaaH*، وتوصل (Weller et al., 2004) الى وجود الجين Vir E2 ضمن بلازميد عزلات الاكروبيكتريوم من استعمال بادئ متخصص بذلك والـ 16S RNA.

ونجحت الدراسة الحالية في دعم نتائج الاقتران في انتقال البلازميد Ti من *A.tumefaciens* الى *S. meliloti* المشفاة باعتماد البادئ نفسه للتحري جزئياً عن وجود الجين *rol-B* في البكتريا *Transconjugant sinorhizobium* بعد تضخيم الـ DNA البلازميدي المعزول من هذه العينات، وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما كشف من نتائج لعدد من العاملين ضمن هذا المجال، إذ اعتمد الباحث *Hai-Baozhang* وآخرون (2002) بادئاً متخصصاً لجين المقاومة Rifampicin لتحديد انتقال بلازميد Ti وبضمنه قطعة الـ T-DNA من السلالة *A.tumefaciens* (C58C1) الى العزلة البرية *A.tumefaciens* (A6) بالاقتران. بات أمراً واضحاً ان استعمال الزراعة النسيجية للنباتات تُعد المفتاح الرئيس الذي يضمن ايجاد نظام متكامل يهيئ الفرصة امامنا لتنفيذ بروتوكول متميز لانتاج النباتات المحولة وراثياً (Bajaj, 1998) باستعمال الاكروبيكتريوم بوصفه أحد النواقل الطبيعية لنقل الجينات المرغوب فيها لتطوير النباتات.

وكان هدف الدراسة من تناول نباتات الجت هو لتوظيفها كموديلاً لتنفيذ مختلف الاهداف الوراثية للدراسة الحالية التي تمثلت بجانبين أولهما تكوين العقد الجذرية وتثبيت النتروجين الجوي بالتلقيح بمختلف عزلات *S.meliloti* واعتماد شدة الاصابة وعدد العقد في تقييم السلالة الاكفاً، فضلاً عن التلقيح بالبكتريا الناتجة من الاقتران مع *A.tumefaciens*، وثانيهما اخضاع هذا النظام النباتي لبروتوكول التحول الوراثي للنباتات باستعمال بكتريا *A.tumefaciens* (AtMcol) المعزولة ولأول مرة على مستوى القطر بوصفها ناقلاً لجينات الـ T-DNA ومعرفة مدى كفاءتها في انتاج النباتات المحولة بالمقارنة مع النباتات المحولة باستعمال بكتريا *A.tumefaciens*(C58C1) المهندسة وراثياً.

وعليه فقد تم استعمال هذا النظام في عدة محاور تضمنت:

- ❖ تكوين العقد الجذرية المثبتة للنتروجين.
 - ❖ تكوين مزارع كالس السيقان تحت الفلقية وتمايزها.
 - ❖ تكوين مزارع الاورام التاجية وتمايزها.
 - ❖ استحداث كالس الاورام التاجية وتمايزه لانتاج النباتات المحولة وراثياً.
- وفي مجال استحداث مزارع الكالس، أشارت نتائج هذه الدراسة الى استجابة نباتات الجت *M.sativa* لنظام الزراعة النسيجية من نجاح قطع اجزاء البادرة الثلاثة (الاوراق، السيقان تحت الفلقية، الجذور) وبكفاءة عالية لكن بصورة متباينة لعمليات استحداث الكالس، وربما يرجع هذا التباين الى الدور المعروف لمنظمات النمو في استحداث الكالس من مختلف القطع النباتية وتحفيزه لانتاج النباتات الكاملة منه (الكناني، 1987).
- وظهر ذلك واضحاً من فشل القطع النباتية الثلاث في استحداث كالسها على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو، في حين تميز الوسط MS المدعم بتراكيز متباينة من السايوتوكاينينات والاكسينات في استحداث كالس الاجزاء النباتية المختلفة، إذ حفز وجود هذين النوعين من منظمات النمو انقسام الخلايا واستحداث الكالس (Devlin & Witham, 1983).
- وسجلت أعلى نسب الاستحداث للاجزاء الثلاثة عند استعمال التداخلات المشتركة من Kin, 2,4-D وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشار اليه نتائج عدد من الباحثين من استعمال المنظمات المارة بتداخلات مشتركة لاستحداث كالس الاجزاء المختلفة لنباتات الجت *M. truncatula* (Shah et al., 2003).
- ولا تعني سهولة الحصول على الكالس من اوراق وجذور نباتات الجت في هذه الدراسة بالضرورة سهولة تمايزه، إذ اشارت العديد من الدراسات الى سهولة استحداث كالس مختلف الاجزاء النباتية وصعوبة تمايز كالسها كما هو الحال في صعوبة تمايز كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس (Gongshe & Fuxiong, 2000) وكذلك الحال في نباتات البنجر السكري *Beta vulgaris* التي أظهرت صعوبة واضحة في استحداث كالس وتمايزه وإعادة تكوين النباتات منه (النعمة، 2001)، وكذلك الحال لنباتات الفلفل *Capsicum annum* التي تتميز بسرعة استحداث كالسها وصعوبة تمايزه (Al-mallah & Yosbacki, 2001) وفول الصويا *Glycine max* (النعمي ورشيد، 1996).
- وعلى العكس من ذلك فقد تمكن جمال وعبدالله (2008) من انتاج نباتات بازلاء متميزة من كالس الاوراق والسيقان على وسط MS الحاوي على 2.0 ملغم/لتر BA و 4.0 ملغم/لتر IAA، وايضاً انتاج نباتات من كالس نباتات *Vigna unguiculatus* (Odutayo et al.,

(2005)، ويفسر صعوبة تمايز كالس الاءراق والءذور الى النباتات الكاملة في وسط MS المدعم بمختلف التوليفات الهرمونية في هذه الدراسة وفي نباتات بقولية أخرى الى عوامل عديدة منها ما يتعلق بتركيب الوسط الغذائي ومحتواه من منظمات النمو (سلمان، 1988) هذا فضلا عن نوع الوسط الغذائي B5 (Gambory *et al.*, 1968) أو MS (Murashige and Skooge, 1962) واختلاف الجزء النباتي (النعيمي وجماعته، 1996) والنوع النباتي (Zagorksa *et al.*, 1997) والظروف المؤثرة كدرجة الحرارة والضوء وانتخاب النمط الذي يمتلك القابلية على التمايز (Crea *et al.*, 1995)، وترتبط عملية التمايز بنوع النسيج المختار وطريقة استحداثه، كاستعمال المعلقات الخلوية (Mariza *et al.*, 2003) أو البروتوبلاست المشتق من الكالس (Geetha *et al.*, 2000) أو لاختلاف خلايا الجزء النباتي عن آخر اوالى الحالة الفسيولوجية للخلايا النباتية في وسط الاستحداث المستعمل مع منظمات النمو (Grant & Fuller, 1968) أو الى مصدر القطعة النباتية والظروف البيئية المحيطة من ضوء ودرجة حرارة أو عوامل أساسية مهمة من المواد الغذائية ومنظمات النمو (محمد وعمر، 1990).

أن تعبير الكالس المشتق من السيقان تحت الفلقية عن قدرته في التمايز على وسط الاستحداث وتكوينه للافرع الخضرية ربما يرجع الى الطاقة الكامنة التي تمتلكها الخلايا المكونة لهذا الكالس واستجابته العالية تجاه تركيز منظمات النمو المنتخبة (2.0 ملغم/لتر +2,4-D) (Kin ملغم/لتر) وتوجهه الى التمايز، إذ تعطي المستويات المتوازنة افضل استحداث لنمو الكالس و تمايزه (Hartmann *et al.*, 2002) وللاوكسين دور رئيس في تحفيز الاستجابة النباتية بالتأثير في زيادة ليونة جدار الخلية لنباتية وزيادة نفاذيتها مما يحفز انقسام الخلايا وتمايزها بالتأثير في ايض الاحماض النووية، ويختلف تركيز الاوكسين اللازم لتحفيز مختلف المراحل المتطورة بحسب الجزء النباتي والنمط الوراثي للنبات المستعمل (Rose Nolan, 1995) & في حين يعمل السايبتوكاينين على تمكين الخلايا من الانقسام وتكوين نسيج الكالس غير المتخصص، وتفسر القابلية العالية لكالس السيقان تحت الفلقية على التمايز وتكوين النباتات بمرحلة واحدة في وسط الاستحداث نفسه بأحتوائه على الخلايا المرستيمية المتميزة بقابليتها العالية على الانقسام ومستواها الهرموني الذي يتوازن مع ما هو مضاف من منظمات النمو الى وسط MS للوصول الى حالة التوازن الهرموني لانتاج النباتات بمرحلة واحدة (Hoorie *et al.*, 2007)، الا أن الافرع المتكونة أبدت صعوبة في تجذيرها على الرغم من استعمال مختلف المعاملات من الاوساط ومنظمات النمو كوسط MS0، 1/2MS0، 1/4MS0 والمدعمة بمختلف التوليفات الهرمونية فقد تعذر تجذيرها وأفلمتها ومن المحتمل ان يعزا فشلها الى حالة فسيولوجية معينة (Anwar *et al.*, 2009).

ان البرنامج الذي تبنته الدراسة الحالية في ايجاد بروتوكول كفاء يمثّل نظاماً متكاملًا لتكوين نباتات الجت من كالس السيقان تحت الفلجية لاستئصال مسارات فعالة للحصول على نباتات جت محولة وراثيًا مستقبلاً قائماً على استعمال السيقان مصدراً للحصول على الاورام التاجية وكالسها بفعل الاكروبيكتريوم (Jelenic et al., 2000) ويرجح تفوق الوسط MS على نظيره وسط B5 في عمليات استحداث وتمايز كالس الاجزاء النباتية لاختلاف مكونات الوسطين وتراكم الاحماض الامينية فيها (Hindson et al., 1998).

ان المحور الاخر الذي استهدفته الدراسة الحالية هو احداث التحول الوراثي في نباتات الجت *Medicago sativa* باستعمال السلالة (AtMcol) من بكتريا *A.tumefaciens* المعزولة من الاورام التاجية لنباتات الاس بوصفها عزلة برية ومقارنة نواتج مراحلها المختلفة مع التحول الوراثي باستعمال السلالة القياسية (C58C1) من بكتريا *A.tumefaciens* المهندسة وراثياً، والذي تجسد نجاحه في امتثال بادرات الجت المعقمة وقطع سيقانها المستأصلة لهذه المعاملات من ابدائها توافقاً تاماً مع هاتين السلالتين من حيث تحملها لعملية الحقن المباشر بكثافات مختلفة من اللقاح البكتيري لهذه السلالتين، واقتربت ايجابيتها في استحداث الاورام التاجية (Crown gall) على مناطق الحقن في السيقان تحت الفلجية للبادرات والسيقان المحقونة (McCullen & Binns, 2006; Palumbo et al., 1998) ويعزى الى انتقال قطعة ال-T DNA الحاوية على الجينات المسؤولة عن تكوين الاورام التاجية وتداخلها مع التركيب الوراثي لجينوم خلايا نباتات الجت، وانشائها للاورام التاجية التي تعد أولى علامات حصول التحول الوراثي في النباتات (Islam et al., 1994)، وتشير الدراسات الى امكانية الحصول على النباتات المحولة وراثياً ببكتريا *A.tumefaciens* عن طريق تكوين الاجنة الجسمية Somatic embryo genesis فقد تم الحصول على نباتات *Zea mays L* محولة وراثياً من كالس الاجنة الجسمية المعاملة مع السلالتين EHA101 و EHA 105 من *A.tumefaciens* (Omwoy et al., 2013)، وأعدمت الاجزاء النباتية المستأصلة او الفلق او الاجنة انظمة نباتية ملائمة لعمليات التحول الوراثي بالاكروبيكتريوم (العبيدي، 2011، ابراهيم، 2005) وأجنة الحنطة لتضمين جينات المقاومة لمبيدات الاعشاب باستعمال بلازميد PAm 2100 والحصول على النباتات المتميزة الحاملة لصفة المقاومة بعد عشرة أيام من الزراعة على وسط التمايز (Haliloglu et al., 2004) واجنة كالس *Citrusaunshiu mars* المحولة وراثياً ببكتريا *A.tumefaciens* وانتخبت الاجنة الحاملة لصفة المقاومة للـ Hygromycin بعد 3 أسابيع من الزراعة على أوساط متدرجة في تركيز (20-25) ملغم/لتر Hygromycin (Adnan et al., 2011)، مباشرة أو بتكوين الاعضاء Organogenesis مباشرة من العقد التاجية Crown

gall المتكونة على النباتات الملقحة ببكتريا *A.tumefaciens* حين زراعتها أو كالسها على اوساط تحفيز انتاج الافرع الخضرية (Block et al., 1984).

وحصل على نباتات *Lotus japonicas* محولة وراثياً حين تلقح قطع سيقانها بعد احداث جرح طولي عليها ببكتريا *A.tumefaciens* وزراعتها على وسط B5 المدعم بـ 3.0 ملغم/لتر من كل من 2,4-D و Kin مدة اسبوعاً ونقلها الى وسط B5 المجهز بمنظمات النمو المذكورة آنفاً مع المضاد الحيوي Kanamycine والحصول على افرع خضرية محولة لها القابلية على التجذير والاقلمة في ظروف الحقل (Handberg & Stougaard, 1992)، وحصل على نباتات *Saussure involucrate* محولة وراثياً بتحصين قطع الاوراق مع بكتريا *A.tumefaciens* واستحداث الكالس المحول وراثياً من هذه القطع وامتاز الكالس الناتج بقابليته على تكوين الافرع الخضرية (Hongqing et al., 2012).

وتوسع استعمال *A.tumefaciens* بوصفها ناقلاً في عملية التحول الوراثي ليشمل الاشجار فقد حصل على نباتات متميزة محولة وراثياً عند تحضين *A. tumefaciens* ذي السلالة EHA101 مع أوراق التفاح مدة نصف ساعة (Freddi et al., 1997).

إن الاساس في اليات الاصابة في جنس الاكروبيكتريوم هو تداخل جزء من مادتها الوراثية التي تمر من خلال الجروح المتكونة في النسيج النباتي لتتداخل مع الذخيرة الوراثية للنظام النباتي العائل (Nester et al., 1984)، ويظهر ذلك واضحاً من أهمية احداث الجروح التي تزيد من كفاءة حدوث هذه العملية، وتفسر في ان الانسجة المجروحة تحرر مركبات مثل الاسيتوسيرينكون Acetosyringone و Hydroxyacetosyringone التي تعمل بمثابة عوامل جذب كيميائية لخلايا الاكروبيكتريوم (Shaw, 1991)، وتسهم بشكل كبير في التصاق اعداد كبيرة من الخلايا البكتيرية ودخولها النسيج النباتي (Gray et al., 1988)، ويتبع ذلك تصنيع الاسيتالديهيد متعدد السكريات ونتاج الالياف السليلوزية التي تغلف الجرح النباتي لتعزز من الارتباط الحاصل بين البكتريا والمضيف النباتي (Mattyss, 1983) الذي قد برهن عليه في خطوات التحول الوراثي لنباتات الحمص باستعمال السلالة A281 من *A.tumefaciens* الكفوءة في تكوين الاورام التاجية على النباتات (Islam et al., 1994) التي أعطت نتائج مماثلة للتلقح بالسلالات البرية من هذه البكتريا. إذ تحفز المركبات الفينولية المذكورة آنفاً بعض الجينات المحمولة على بلازميد Ti لبكتريا *A.tumefaciens* وبخاصة مجموعة جينات Vir genes المسؤولة عن احداث الامراضية بتحفيزها على انتقال جزء من بلازميدها المتمثل بقطعة T-DNA وتداخله مع المادة الوراثية للخلايا النباتية المستهدف تحولها وراثياً (Morris, 1986)، إذ تحفز هذه المركبات جينات (Vir A, Vir G) المستقرة في بلازميد Ti خارج قطعة

T-DNA و يُعد Vir A مستقبلاً كيميائياً يستشعر بوجود الفينولات المتخصصة كالاسيتوسيرنكون المتحررة من الجروح النباتية (Bolton et al., 1986) وتحفز جينات Vir A مجموعات Vir G من تشفيره للبروتين، مما يؤدي الى تنشيط استنساخ عوامل الامراضية الاخرى التي تشمل جينات Vir C و Vir D التي تعمل على مضاعفة قطعة الـ T-DNA المنقولة بحجم 25bp ومعالجتها من تشفيرها للانزيمات القاطعة Endonuclease (Vergunst., 2000) وتحفيز جينات Vir B و Vir E والتي تسهم بروتيناتها في انتقال الـ T-DNA بعد تكوين المعقد البروتيني Protein-DNA واختراقه لاغشية الخلايا، وتداخله مع جينوم الخلية المصابة (Yusibov et al., 1994) لينتج ما يعرف بالـ rec-DNA عند التداخل مع الذخيرة الوراثية للنبات، الذي يشفر انزيمات تعبر عن حصول حالة التحول الوراثي في النبات (Lehman et al., 1994).

ويفسر استجابة بادرات الجت في تكوينها للاورام الى التداخل بين نبات الجت وسلالتي البكتريا المعزولة والمهندسة وراثياً قيد الدراسة، وتداخل جينوم الخلايا النباتية والبكتيرية من تكوين الاورام التاجية المحولة وراثياً بدليل بناء الاوبين (Octopine, Nopaline) في هذه الاورام الذي يتكون بفعل الجينات المسؤولة عن التشفير لتصنيع الاوبينات المنقولة على قطعة T-DNA الى جينوم الخلايا النباتية المحولة وراثياً والتعبير عنها بتصنيع هذه الاحماض الامينية غير الاعتيادية (Goldmann., 1977; Fraley et al., 1983)، وعلى المستوى الجزيئي يفسر تكوين الاورام التاجية على البادرات وسبقانها تحت الفلقية المستأصلة منها والملقحة بالسلاطين كلتيهما الى الانتقال الناجح لجينات (*tmr, tml, tms*) وتداخلها مع جينوم النبات لتشفير الهرمونات النباتية كالاوكسينات والسايوتوكاينينات التي تسيطر على تكوين الورم النباتي الناتج عن الاصابة، علماً أن هذه الجينات تتواجد في البلازميدات التي تعود Octopine type و Nopaline type، إذ يشفر الجين *tmr* السايوتوكاينينات التي تسبب الانقسامات غير الاعتيادية في الخلايا النباتية المصابة بهذه البكتريا التي ينتج عنها تكوين الاورام التاجية (Pulawska & Sobiczewski, 2004)، وتكوين الافرع الخضرية المباشرة من الاورام التاجية المتكونة على البادرات او سبقانها المحقونة بالبكتريا، في حين يحدد الجين *tml* وحجم الاورام التاجية المتكونة وموقعها على النبات، أما الموقع الثالث *tms* فيشمل *tms1 (iaam)* و *tms2 (iaaH)* وهي الجينات المسؤولة عن التشفير لبناء الاوكسينات، والتي ربما تفسر حالة ظهور الجذور العرضية والثانوية في البادرات المصابة بـ *A.tumefaciens* فضلاً عن اسهامها مع السايوتوكاينين في تكوين الاورام (Gray et al., 1988)، إذ يشفر الجين *tms* انزيم Indol-3-acetomide الذي يحول التريبتوفان الى

(IAM)، في حين يشفر الجين *tml* انزيم amidohydrolase الذي يحول (IAM) الى Indole-3- acetic acid (IAA) (Klee et al., 1984)، هذا فضلاً عن تعبير جينات *tzs* خارج T-DNA في النباتات المحولة نتيجة لتحفيز الفيڤولات التي تفرزها هذه النباتات لجينات (*Vir genes*) وبشكل خاص تحفيزها لجينات *Vir A* و *Vir G* التي ينتج عنها تعبير جينات *tzs* من تشفيرها لبناء Zeatin و ribosyl Zeatin التي ادت الى اخلال التنظيم الهرموني في الخلايا المحولة وراثياً، مما ينعكس على مساراتها الايضية متمثلة بانقسام هذه الخلايا وتكوينها لهذا النوع من الاورام (Morris, 1988)، إذ وجد ان ارتفاع نسبة الاوكسين الى السايوتوكاينين يثبط تكوين الافرع الخضرية بالاعتماد على فعالية الجينات المسؤولة عن تصنيع الأوكسين والسيوتوكاينين المنقولة من T-DNA الى النبات الذي تباين في امكانية تكوينه مع تباين عمر النبات (Black et al., 1986) ويعد انتخاب العمر المناسب لتلقيح البادرات من الامور الاساسية لانجاح عملية التحول الوراثي، اذ ابدت البادرات التي بلغت أعمارها اربعة أسابيع أعلى قابلية على الاصابة وتكوين الاورام تلتها البادرات بعمر خمسة أسابيع، وربما يعود ذلك الى عدم تحمل البادرات الاقل عمراً للضراوة والامراضية الشديدة التي قد تحدثها هذه البكتريا ثم موتها، وهذا السبب يعزز تفوق البادرات على قطع السيقان في تحملها للقاح البكتيري الذي يرجع الى اختلاف الجزء النباتي ولاهمية ملائمة الجزء النباتي او النمط الوراثي للنبات وتوافقه مع السلالة البكتيرية الملائمة لظهور مظاهر التحول الوراثي وتكوين الافرع الخضرية التي تمتلك صفات تغيرات جسمية Somaclonal variation كما في نبات Cowpea (Raveendar & Ignaciumuthu., 2010).

فضلاً عن أن السبب في تباين استجابة بادرات الجت أو قطع سيقانها للتلقيح بالحقن المباشر ببكتريا *A.tumefaciens* باختلاف كثافة اللقاح البكتيري، ويمكن أن يرجع الى اختلاف مجاميع الخلايا المصابة ونسبة استجابتها لتكوين الاورام وما يتبعها من تغيرات نتيجة لمدى التداخل الناجح بين الجزء النباتي حين استعمال الكثافة الملائمة من اللقاح البكتيري، إذ اشارت إحدى الدراسات (Liu et al., 2004) إلى ان كفاءة ايصال قطعة T-DNA وتداخلها مع جينوم النبات تعتمد بالدرجة الاساسية على السلالة البكتيرية وبلازميها والجزء النباتي المستعمل، وكثافة اللقاح البكتيري، وقد سجل اعلى تردد للتحول الوراثي في نباتات فول الصويا المحولة حين عومل مع بكتريا الاكروبيكتريوم بكثافة ضوئية (OD 1.0) (Ko & Karban, 2004) فضلاً عن أن حقن البادرات او سيقانها ببكتريا *A.tumefaciens* دفع الى تكوين الاورام التاجية المحولة وراثياً في بضعة أيام او الى بضعة اسابيع وجاء هذا التباين بالاعتماد على نوعية الجزء النباتي المستعمل (السيقان، البادرة بأكملها)، وكذلك على اختلاف السلالة

المستعملة فضلاً عن ظروف التداخل بينهما (Omwoy *et al.*, 2013) وهذا يفسر اختزال المدة الزمنية لتكوين الاورام التاجية على السيقان المحقونة بـ (*A.tumefaciens* (AtMcol) البرية مقارنة بتكوين نظيراتها من الاورام التاجية في مواقع حقن السيقان لبادرات الجت حين الحقن بالسلالة (*A.tumefaciens* (C58C1) وحين استعمال السلالة (A6 Binns) من *A.tumefaciens* في تلقیح بادرات الحلبة *Trigonellofo enumgreacum* التي ظهرت الاورام بعد (26) يوماً من حقنها بالبكتريا (ياسين، 2000).

وأفاد العديد من الدراسات أن ضمان نجاح عملية التحول الوراثي يعتمد على خطوات حرجة وظروف مثلى تضمن انتقال T-DNA وتداخلها مع الذخيرة الوراثية للنبات وان من أبرز هذه العوامل النمط الوراثي للنبات، السلالة البكتيرية المستعملة وكثافة اللقاح، وشدة الاضاءة التي تسهم بشكل فعال في انتخاب بروتوكول مثالي يضمن انتقال الجينات المسؤولة عن التحول وتعبيرها فيه (Chkrabarty *et al.*, 2002)، هذا فضلاً عن محددات أخرى للتداخل والتي قد برهنتها الدراسة الحالية التي تمثلت في استعمال الوسط بنصف قوته التركيبية باختزال املاحه الذي حفز اصال قطعة الـ T-DNA الى النسيج النباتي (Armstrong & Rout, 2001)، فضلاً عن أن اعتماد درجات الحرارة المنخفضة يسهم بشكل كبير في انتاج جينات الامراضية في عدد من انواع البكتريا، إذ تكون اكثر استقراراً في درجات الحرارة المنخفضة، ويمكن أن تعمل في درجات حرارية قصوى تتراوح ما بين 22-28 م° (Gonzalez *et al.*, 2008)، ولهذا السبب أخذت هذه المسألة بنظر الاعتبار حين تلقیح البادرات بالبكتريا مع اختزال شدة الضوء لضمان نمو البكتريا وأداء عملها في تكوين الاورام في اثناء تطبيق بروتوكول التحول الوراثي في الدراسة الحالية.

وتعد مرحلة إزالة بكتريا الاكروبيكتريوم من الاورام التاجية من الامور الاساسية لتجنب التداخل الذي يمكن أن يحصل بين الخلايا المحولة وراثياً وبكتريا الاكروبيكتريوم ويؤثر سلباً في نمو الانسجة المحولة وراثياً (Zia *et al.*, 2010)، إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية نجاح استعمال الـ Cefotaxime والـ Chloramphenicol لأشفاء هذه الانسجة من البكتريا (*A.tumefaciens* (AtmCol) و (*A.tumefaciens* (C58C1) على التوالي والتخلص منها، وترجع فعالية هذه المضادات من دورها المتوقع في تغيير أزموزية الاغشية الخلوية البكتيرية وتأثيرها في المسارات الخاصة بتصنيع البروتينات والانزيمات ومضاعفة الاحماض النووية وعمليات الانقسام الخلوي الذي يؤدي الى موت البكتريا والتخلص من تأثيراتها في الانسجة النباتية (Shishido & Piepper., 1990; Yassin *et al.*, 2005).

ويرجح أن للمضاد الحيوي دوراً مهماً في التحول الوراثي، إذ وجد أن التركيز 250 ملغم/لتر يعمل على قمع البكتريا وانجاح عملية التحول الوراثي في الرز بيدا أن التركيز الاعلى من ذلك يحد من تكون الكالس ويختزل نسبة التحول الوراثي الى ثلاثة أضعاف عما هو عليه (Cheng *et al.*, 1997)، فضلاً عن ان اضافة 100 ملغم/لتر من Kanamycin يجهز بكفاءة عالية لاحداث التحول الوراثي في نبات *White spruce* (Lee *et al.*, 2001) ويسهم بشكل فعال في انتخاب الافرع الخضرية المحولة وراثياً لنبات البازلاء (Thu *et al.*, 2003).

إن نجاح الاورام التاجية المحولة وراثياً في تكوينها لكتل الكالس تلقائياً في عدة أوساط بضمنها أوساط المقارنة MS0، MS01/2 يبرهن بما لايقبل الشك انتقال الجينات المحمولة على T-DNA من البكتريا الى جينوم خلايا السيقان تحت الفلقية ونجاح تعبيرها المقترن بدور جينات (*tms1*)، (*tms2*) المسؤولة عن تصنيع الاوكسينات و(*tmr*) المسؤولة عن تصنيع السايوتوكاينينات (Gray *et al.*, 1988)، إذ تفسر قابلية الاورام التاجية على استحداث الكالس في اوساط خالية من منظمات النمو او بغياب السايوتوكاينين الى قابلية انتاجها لمنظمات النمو بكميات تفيض عن احتياجاتها الفسيولوجية ويعزز حدوث حالة تغيرات في التوازن الهرموني، والتي في النهاية حفزتها على النمو والانقسام في الاوساط الخالية من منظمات النمو، لتمثل حالة من حالات الانتخاب للكالس المحول وراثياً كما في كالس الاورام التاجية للباقلء (Jelenic *et al.*, 2000) المستحدث على وسط MS0، وانتخاب نباتات الجت المحولة وراثياً المقاومة Neomycin و Kanamycin (Mckersie *et al.*, 1993).

وعلى الرغم من الصعوبة التي تبديها النباتات العنيدة كالبقوليات والحبوب في استجابتها لعمليات التحول الوراثي، التي لم تتجاوز نسبة حدوثها 1% في بعض النباتات (Gustavo *et al.*, 1998) وفي فول الصويا (Yan *et al.*, 2000)، فإن النجاح الذي حققته الدراسة الحالية في انتاج عدد من الافرع الخضرية محولة وراثياً من مزارع الاورام التاجية في وسط WP01/2 على الرغم من كونها حالة مباشرة فانها تمثل حالة متميزة ضمن بروتوكولات التحول الوراثي للبقوليات لانها حققت تردداً مرتفعاً نسبياً يصعب الحصول عليه في مثل هذه الانظمة النباتية (Jelenic *et al.*, 2000)، وكذلك الحال للافرع الخضرية الناشئة من الكالس المحول والمشتق من الاورام على وسط MS1/2 المدعم بمنظمات النمو الذي بلغ معدل عدد أفرعها (2-3) فرع/قطعة كالس وأظهر مساراً بطيئاً بالمقارنة مع نشوئها من الاورام مباشرة، واتصفت الافرع المتميزة بمظهرها المتغاير مظهرياً عن الافرع الناشئة من كالس السيقان تحت الفلقية حيث اتصفت بتقزم مجموعها الخضري واختزال اوراقها والنقاؤها، وبشكل مماثل لما حصل في نباتات عنب الذيب المحولة وراثياً ببكتريا *A.rhizogenes* التي اتصفت ايضاً بقصر أطوالها وبمقدار

حجم اوراقها وقصر السلاميات واختزال عدد الاوراق التوجيهية (صالح، 2002) ونباتات *Colletotrichum graminicola* (Flowers & Vaillancourt, 2005)، ويعتمد ظهور هذه التغيرات المظهرية المتوقع حدوثها في النباتات المحولة وراثياً على نوع السلالة البكتيرية المستعملة ونوع النبات (Porter, 1991)، ويرجع تحفيز هذه التغيرات في الافرع المحولة وراثياً الى مجموعة الجينات المنتقلة ضمن الـ T-DNA التي تشمل جينات Onc-genes المعروفة بمسؤوليتها في تنظيم نمو الخلايا وتمايزها من التلاعب وتغير التوازن الهرموني في الانسجة النباتية المحولة وراثياً (Barry et al., 1984).

إن اختبار كالتس الاورام التاجية والافرع المحولة وراثياً على النمو في الاوساط الانتخابية في هذه الدراسة يعطي تفسيراً مبدئياً لتضمين جينات مقاومة Rifampicin والد Gentamycin في هذه الانسجة واحتفاظها بها، وتظهر هذه النتائج نجاح التعبير الجيني لجينات الـ T-DNA الموجودة في بلازميد الـ Ti لكل من البكتريا المعزولة والمهندسة وراثياً من *A.tumefaciens* كما حصل في انسجة نبات الحمص المقاومة للـ Kanamycin بتركيز (100-150) ملغم/لتر (Sanyal et al., 2002) ومقاومة نباتات الجت للـ Kanamycin و Streptomycin (Palumbo et al., 1998)، ويظهر ذلك واضحاً من فشل كالتس السيقان تحت الفلقية والافرع الناتجة منه في النمو على الاوساط الحاوية على الـ Rifampicin والد Gentamycin لفقدانها القابلية على مقاومة هذه المضادات الحيوية التي أثرت سلبياً في المسارات الايضية انتهت بموتها كما لوحظ في نباتات *Cowpea vigna* (Raveendar & Ignacimuthu, 2010)، فضلاً عن أن الزيادة الحاصلة في محتوى الـ DNA المعزول من انسجة الاورام وكالتسها المحول وراثياً والافرع الناتجة من الاورام بالمقارنة مع محتوى الـ DNA في عينات المقارنة والسيقان تحت الفلقية وكالتسها والافرع الناشئة منه يؤكد انتقال عدد من جينات الـ T-DNA ونباتها في هذه الانسجة (العززي، 2013).

واستقطبت تقانة PCR في الاونة الاخيرة اهتمام العديد من الباحثين في مجال الهندسة الوراثية والتحول الوراثي للنباتات (Wu et al., 2003; Debasis et al., 2006)، إذ اظهرت احدى الدراسات نجاح توارث قطعة الـ T-DNA في نباتات *Citrus unshiu mare* المحولة وراثياً وبضمنها جين المقاومة للـ hygromycin باستعمال السلالة EHA 105 من *A.tumefaciens* الحاملة لبلازميد PCAMBIA 1300 (Adnan et al., 2011) ونجاح التعبير الجيني لجينات *bar gene* في جينوم نبات الذرة المحولة وراثياً بحشر جينات الـ PTi-T-DNA للسلالة EHA 105 من *A.tumefaciens* فيها، وبلغ حجم القطعة المضخمة فيها

للجين المذكور 730 bp (Omwoy *et al.*, 2013) مما يؤكد انتقال قطعة الـ T-DNA وتداخلها مع جينوم النبات ونجاح التعبير الجيني لها في الاجيال اللاحقة.

واستكمالاً لاهداف البحث ركزت الجهود المبذولة في هذه الدراسة أحد اتجاهاتها في استعمال واحدة من أهم التقانات الحديثة للـ PCR المتمثلة باستعمال بادئات متخصصة للكشف عن جينات الـ T-DNA لاحتفاظ جينوم انسجة الجت *Medicago sativa* المحولة وراثياً والمتمثلة بالاورام التاجية وكالسها بالجين *rol B* ونجاح تضمينه واستقراره بشكل واضح في الافرع الخضرية الناتجة منها وانعكس من بيانات التفاعل التضاعفي المتسلسل PCR. فقد أظهرت النتائج في هذا المجال ارتباط جينات T-DNA في جينوم السيقان تحت الفلقية (المصابة) وتعبيرها في تكوين الاورام التاجية وتحفيزها لنشوء الافرع الخضرية مروراً بمرحلة الكالس (Block *et al.*, 1984) الذي يعزى الى انتقال قطعة الـ T-DNA وارتباطها وتداخلها مع الذخيرة الوراثية لخلايا هذه الانسجة، إذ برهنت النتائج ان محددات التداخل والارتباط لهذه القطعة في مناطق نشطة جعلتها مؤهلة لعملية الاستساخ والتعبير الجيني الذي كُشف عنه بتقانة PCR بالبادئات المتخصصة Specific Primers لتضخيم الجين *rol B* المنشط لعمل جينات المقاومة للـ Rifampicin والـ Gentamycin الذي ظهر واضحاً من تحمل الكالس والافرع الخضرية المحولة للمضادين في الاوساط الانتخابية ومقاومتها لانتقال هذه المضادات الى داخل الخلايا ومنعها من احداث تغيرات فسيولوجية في ازموزية ونفاذية اغشيتها، فضلاً عن الجين المشفر للاوبين والذي عبر عنه بتكوين الاحماض الامينية غير الاعتيادية (Octopine, Nopaline) والجينات المشفرة للاوكسينات والسايبتوكاينينات (*iaaH, iaam*) و (*tmr*) بدلالة اختلال التوازن الهرموني داخل الخلايا النباتية وزيادة انقسامها وانتاجها للانزيمات لبناء الاوبينات (Goldmann, 1977; Pulawska & Sobiczewski, 2004) التي عبر عنها مظهرها بتكوين الاورام التاجية في مناطق الجروح على النسيج النباتي الملقح وتمايز الافرع الخضرية منها بالناقل البكتيري الحامل لبلازميدات pTi-T-DNA وفسرت على المستوى البيولوجي الجزيئي باحتفاظ جينوم هذه الانسجة بالجين *rol B* وبنثبات تعبيرها التي كُشف عنها بهذه التقانة. وهناك العديد من الدراسات في العالم ضمن هذا الحقل توافقت مخرجات نتائجها مع ما جاء من نتائج في هذه الدراسة، إذ شُخص الجين *rol B* في نباتات *Prunus cerasus* و *Prunus canescens* و *Cydonia oblonga* المحولة وراثياً ببكتريا *A.tumefaciens* (Staniene *et al.*, 2007) والذي اظهر تأثيراً واضحاً من تقزم النباتات الناتجة عن الزراعة المرافقة مع هذه البكتريا ، وكذلك الحال مع ما توصل اليه الباحث (Kiani *et al.*, 2012) والتي كشفت عن تداخل الـ T-DNA لسلالة البكتريا (LBA 4404) *A.tumefaciens* مع

انسجة نباتات *Artemisia dubia* المحولة وراثياً بتشخيص جينات *rol ABC* وثبات تعبيرها الجيني فيها. في حين استعمل البادئ المتخصص للكشف عن الجين *rol B* في انسجة نباتات *Cydonia oblonga* المحولة وراثياً ببكتريا *A.rhizogenes* وأظهرت حزماً منفردة على هلام الاكاروز تساوي تقريباً 800 زوج قاعدي لتؤكد انتقال الـ T-DNA وتداخلها من الكشف عن الجين المار في الانسجة المحولة وراثياً (Razanskiene et al., 2006).

وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصلت اليه مختلف الدراسات في النباتات البقولية، فقد سُخِّص جين *uid A* في نباتات الجت والعدس المحولة وراثياً بالسلالة LAA 4404 لبكتريا *A.tumefaciens* الحاملة لبلازميد PTOK 233 (Ninkovic et al., 2004; Nikolic et al., 2007)، وجينات مقاومة الانجماد *neo genes* (Bryan et al., 1993)، وأشارت إحدى الدراسات الى نجاح التعبير الجيني لجين المقاومة Hygromycin Phosphot Transferase (*hpt*) في جينوم نباتات *Vigna unguiculata* L المحولة وراثياً بسلالة LBA 4404 لبكتريا *A.tumefaciens* الحاملة لبلازميد PCAMBIA 1305 (Raveendar & Ignacimthu, 2010).

الاستنتاجات والتوصيات

***Conclusions &
Recommendations***

1. في خطوة هي الاولى من نوعها على مستوى القطر، تمكنت الدراسة الحالية من عزل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) وتشخيصها من العقد التاجية واستعمالها كناقل Vector للتحويل الوراثي بعد تشخيصها بالاختبارات الجزيئية باستعمال بادئات متخصصة في تقانة مؤشرات التضاعف الخاص sPCR، فضلاً عن تشخيصها بالفحوصات الكيموحيوية والبايولوجية.
2. أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز نجاح الانتقال الافقي للجينات بعلميتي الاقتران البكتيري والتحول الوراثي في نباتات الجت.
3. قدمت الدراسة نموذجاً متميزاً في مجال الدراسات الوراثية بتسخير عملية الاقتران البكتيري في الحصول على بكتريا مقترنة ذات خصائص وراثية جديدة يمكن الافادة منها في مجال كسر التخصص العائلي وتحسين تثبيت النتروجين الجوي ونقل صفات مرغوبة للنباتات.
4. تعد طريقة تضمين جينات T-DNA باستعمال تقانة الحقن المباشر ونجاح تعبيرها الجيني بدلالة تكوين الاوبينات وظهور حزم الحمض النووي المضخم بتقانة PCR المرحلة على هلام الاكاروز، من الانظمة الكفاءة لانتاج نباتات محولة وراثياً من الاورام التاجية.
5. لم تظهر الاختبارات الكيموحيوية والبايولوجية لعزلات الرايزوبيوم الاربعة (Rh1, Rh2, Rh3 and Rh4) اختلافات واضحة باستثناء تفوق العزلة Rh1 باصابة بادرات الجت عن بقية العزلات.
6. أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز للحمض النووي البلازميدي احتواء العزلة البرية (*Agrobacterium tumefaciens* (AtMcol) على حزمة بالتناظر مع احتواء العزلة القياسية (*Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) على حزمتين، وفي هذا السياق ايضا اظهرت النتائج احتواء العزلتين (Rh4، Rh1) على حزمة احتواء العزلتين (Rh3، Rh2) على حزمتين.
7. كفاءة المحيد الكيمياوي Aqrudin orang في تحييد محتوى الـDNA البلازميدي في جنسي *Agrobacterium* و *Rhizobium* التابعين لعائلة *Rhizobiaceae*.

1. اعتماد نظام هذه الدراسة أنموذجاً فعالاً واختبار تطبيقه مع نباتات بقولية أخرى.
2. إجراء دراسة مستقبلية تتعلق بعزل البروتوبلاست المحول وراثياً من الاورام التاجية ودمجه مع بروتوبلاست انماط وراثية جديدة بهدف الحصول على نباتات محسنة وراثياً.
3. دراسة نسيجية بالمجهر الضوئي للعقد الجذرية والاورام التاجية والاورام الشبيهة بالعقد المتكونة بفعل البكتريا المقترنة واجراء مقارنة فيما بينها من حيث تواجد البكتري والتراكيب النسيجية الاخرى، والتحري عن اشكال البكتريود في العقد الجذرية ووصوله الطور الناضج المثبت للنتروجين الجوي.
4. استعمال المجهر الالكتروني لإجراء دراسة نسيجية وذلك بعمل مقاطع طولية للعقد الجذرية والاورام التاجية ومقارنتها من حيث طبقات القشرة والحزم الوعائية والتباين النسيجي بينهما.
5. جمع مختلف العزلات من الرايزوبيوم من مناطق مختلفة من القطر واجراء تقانة تفاعلات مؤشرات التضاعف العشوائي RAPD-PCR باستعمال العديد من البادئات العشوائية لاعطاء صورة واضحة وبمستوى عالٍ عن التباين الوراثي فيما بين هذه العزلات.
6. إجراء دراسة تتابع القواعد النتروجينية Sequence على العزلات المعزولة ومتابعة هذه التتابعات ومقارنتها مع قاعدة البيانات بنك الجينات ببرامج التحليل الوراثية ويجاد شجرة القرابة بين العزلات، وتطبيق هذا البرنامج مع العينات المقترنة لدعم نتائج الاقتران.
7. تحويل العزلة البرية واعتماد بلازميدها ناقلاً لصفات جديدة بادخال جينات لصفات مرغوبة على البلازميد كمقاومة الملوحة والمبيدات والجفاف باستعمال الانزيمات القاطعة بعد تحديد اماكن القطع وتضمين الجينات المرغوبة فيه بتقنية كلونة الجين Gene Cloning، وإدخاله الى النبات المستهدف تحوله وراثياً بأحدى تقانات التحول الوراثي المختلفة.

المصادر

References



ابراهيم، ضياء ايوب. (2005). نقل جينات الشد الحيوي GST, LeTPX1 بوساطة الناقل *Agrobacterium tumefaciens* الى الاجنة الناضجة وانتاج نباتات حمص معدلة وراثياً. أطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

الاسمري، هادي بن محمد عبدالله. (2007). خصائص رايزوبيا البرسيم الحجازي المستوطنة بترب المملكة العربية السعودية. رسالة ماجستير، كلية علوم الاغذية والزراعة، جامعة الملك سعود، المملكة العربية السعودية.

البرهاوي، نجوى ابراهيم خليل. (1999). المعاملة الانزيمية للشعيرات الجذرية في ازالة التخصص العائلي، وتحسين ونقل تثبيت النتروجين في البقوليات وغير البقوليات. اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

البياتي، فراس عباس. (2002). احداث التغيرات الوراثية في بذور ونباتات وكالس فول الصويا *Glycine max L* باستخدام اشعة كاما وتأثيراتها على المحتوى البروتيني ونسبة الزيت. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

جمال، بادية عبدالرزاق ;وعبدالله، عدنان محمود. (2008). انتخاب نباتات بازلاء *Pisum sativum L* متميزة من مزارع كالس الاوراق والسيقان ومقاومة لفطر *Fusarium solani*. مجلة التربية والعلم، 21: 38-49.

الجواري، سهلة محمد زيدان شعيب. (2004). الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان مع بلازميدات Ri في الحصول على نباتات الباقلاء *Vicia faba L* المحولة وراثياً. اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

الحسو، محمود زكي ;والطائي، محمد ابراهيم. (2008). تقدير حساسية بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv.vicie* لمجموعة مضادات البيتاالاكتام. مجلة التربية والعلم، 21(3)، 66-75.

دلالي، باسل كامل. (1986). اساسيات الكيمياء الحيوية، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

الزبيدي، اريان محمد حامد اسماعيل. (2005). نقل بلازميدات بكتريا *S.meliloti* الى بكتريا *E.coli* بطريقتي الاقتران البكتيري والتحول الوراثي ودورها في تكوين العقد الجذرية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.



المصادر

- الزهيري،** عمر عبد العزيز احمد شهاب. (2002). دلائل التخصص العائلي والتحول الوراثي، بين نباتات البرسيم الابيض وبكتريا Rhizobia التعايشية و *Agrobacterium* المهندسة وراثيا ، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.
- سلمان،** محمد عباس.(1988). أساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية .دار الكتب للطباعة والنشر.جامعة الموصل.
- السلمان،** توفيق بشير. (2008). تحسين تثبيت النتروجين الجوي تكافلياً في نباتات الجب *M.sativa* المحولة وراثياً ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 في خارج الجسم الحي، اطروحة دكتوراة، كلية الزراعة ، جامعة الموصل، العراق.
- الشكرجي،** محمد عبدالاله. (2013). عزل وتشخيص بكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لبعض النباتات البقولية وتوصيف محتواها البلازميدي، أطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل،العراق.
- صالح،** شفاء مهدي. (2002). بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 ناقلا طبيعيا في التحول الوراثي لنباتات عنيب الذيب *Solanum nigrum* اطروحة دكتوراه ، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.
- العبيدي،** كرم ثامر عزيز محمد. (2011). تأثير الامواج فوق السمعية في استحداث وتمايز كالس بادرات السنامكي *Cassia acutifolia* وتحولها وراثيا ببكتريا *A.rhizogenes*، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.
- عجام،** قاسم عبدالامير .(1986). في التطور الزراعي تعايش بكتريا الرايزوبيا والبقوليات، أسسه وتطبيقاته، دار الشؤون الثقافية العامة، وزارة الثقافة والاعلام، مطابع دار الشؤون الثقافية العامة.
- العنزي،** امجد عبد الهادي محمد.(2013). احتفاظ نباتات الجزر *Daucus carota* L بمجموعة *rol*-genes الناتجة من انسجته المحولة وراثيا ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R 1601. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل،العراق.
- الفليح،** خولة أحمد. (2000). مدخل الى الكيمياء الحياتية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.
- الفصيل،** عبد الحسين. (1999). الهندسة الوراثية، دار الشروق للنشر والتوزيع، رام الله-المنارة.



المصادر

- القصيمي،** علياء حازم عبد الرزاق. (2006). الفعالية البايولوجية لعدد السكريات الدهنية المستخلصة من بكتريا *S.meloloti* على تكوين العقد الجذرية واستحداث الكالس وانقسامات خلايا المعلقات الخلوية لبادرات الحلبة *-Trigonella foenum-graecum* رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.
- الكناني،** فيصل رشيد ناصر. (1987). زراعة الانسجة والخلايا والنباتية ، دار الكتب للطباعة والنشر، جامع الموصل.
- محمد،** عبدالمطاب سيد;وعمر، مبشر صالح. (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء للنبات، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.
- معارج،** محمد عبد المحسن. (1999). مقدمة في الهندسة الوراثية، كلية الطب البشري، جامعة الموصل.
- معيوف،** محمود احمد. (1982). مدخل الى البقوليات في العراق. ، مطبعة جامعة الموصل، العراق.
- الملاح،** مزاحم قاسم; والبرهاوي، نجوى ابراهيم. (2000). ابتكار تقنية جديدة لتكوين العقد المثبتة للنتروجين الجوي في الحنطة والشعير والطماطة بواسطة الرايزوبيوم الطبيعية ، براءة اختراع 3914، الجهاز المركزي للتقيس والسيطرة النوعية.
- الملاح،** مزاحم قاسم; وزيدان، سهلة زيدان. (2008). تأثيرات نوعية الوسط الغذائي وكثافات زراعة المعلقات الخلوية لنبات فول الصويا بطريقة الطمر في قطرات الاكار في تكوين بادئات الكالس. مجلة زراعة الرافدين، المجلد (36)، العدد (4) SSN 1815-316X.
- المهداوي،** مثنى محمد ابراهيم. (2013). التلاعب الوراثي والكهربي لنباتات الحلبة *-Trigonella foenum-graecum* مع عزل الدايبوسجين والترايكونيلين من المزارع النسيجية المختلفة، أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.
- النعمة،** قتيبة شعيب. (2005). زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا *Glycine max* صنف اباء في قطرات الاكار المتعددة، مجلة التربية والعلم، 17: 129-120.
- النعمة،** قتيبة شعيب محمد صالح. (2001). التحفيز الكهربي في تكوين الجذور الشعرية المحولة وراثياً وزراعة انسجة نباتات البنجر السكري *Beta vulgaris L*، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.



المصادر

النعمي، عبدالله نجم ; والملاح، مزاحم قاسم; ومحمد، عبدالمطلب سيد .(1996أ). انتاج نباتات من كالس الاجزاء النباتية المختلفة لبادرات الجت *Medicago sativa*. مجلة التربية والعلم، 26: 33-40.

النعمي، عبدالله نجم; الملاح، مزاحم قاسم ; ومحمد، عبد المطلب سيد. (1996ب). تكوين نباتات جديدة من كالس الاجزاء النباتية المختلفة لنباتات فول الصويا *Glycine max* L، مجلة مؤتة للبحوث والدراسات، 11: 10-30.

النعمي، عبدالله نجم; ورشيد، جميلة هزاع. (1996). استحداث الكالس من الاجزاء النباتية المختلفة لبادرات فول الصويا *Glycine max* L لسنفي 84 Weber و William. مجلة التربية والعلم، 3: 53-60.

النعمي، أحمد عبد الرحمن; وحسين، صديق.(2002). التسميد البيولوجي للأرز الحساوي والبرسيم الحجازي. المملكة العربية السعودية ،جامعة الملك فيصل ،عمادة البحث العلمي.

فيصل، ريان مازن ; والحيالي، فادية موفق (2012). تعيين مواقع المورثات المحللة للسليوز في بعض الانواع العائدة لجنس *Pseudomonas* ودراسة امكانية زيادة قدرة التحلل باستعمال تقنية تضخيم محتوى الـ DNA البلازميدي. المجلة العراقية للتقانات الاحيائية، 11(2) : 151-162.

ياسين، جاسم محمد. (2000). التحول الوراثي في نباتات الحلبة -*Trigonella foenum-graecum* بواسطة بلازميدات Ti و Ri لبكتريا *Agrobacterium*، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

ياسين، جاسم محمد. (2011). التحول الوراثي لبكتريا *S. meloloti* بواسطة بلازميدات بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* باستخدام تقنية الأقتران.مجلة علوم الرافدين، 22(3):22-34.



- Abdul-Mannan**, Syed,T.N. and Mirza,B.(2009) .Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L.Pak.J.Bot.,41:3239-3246.
- Adnan,M. D.;**Al Bachchu; Jin,S.B; Park,J.W; Sun,H.J; Suhym; Lee,H.Y; Lee,D.S; Hong,Q.C; Kim,W.Y; Riu,K.Z. and Kim,J.H. (2011). *Agrobacterium*-mediated transformation using embryogenic calli in satsuma Nandarin (*Citrus urshiu* Marc) cv. Miyagawa Hort Env.Biot.,52(2):170-175.
- Ahmed,K.D.**(1989). The positive control of live expression in *E.coli* K-12 Ph.D.Thesis,Univ. Duram,England.
- AL- Mallah, M.K.** and Al-Yozbaki,G. S(2001). In vitro callus induction from capsicum annum seedlings (sweet and chili pepper). J.Biot. Res.,3:34-44.
- Al-Mallah, M. K. ;** Davey, M. R. and Cocking, E. C. (1987). Enzymatic treatment of clover root hairs removes a barrier to *Rhizobium*-host specificity. Biot ., 5: 1319-1322.
- Al-kahtani,M.K.;**Alkhalil,H;Alkadeeb,S. and Hassan,H.Z.(2008). Molecular genetic finger print of some streptomycetes isolated from Riyadh city. Sandi J. Bio. Sci.,15: 243-251.
- Al-Kanaany ,C. F.;** Hisham, F; Al-Yassri. and Al-Mousawi,A. (2012). Plasmid profile of two isolates of *Sinorhizobium meliloti* isolated from different soil areas in Basrah Iraq. Bas. J. Agr. Sci., 25: 13-18.
- Allen,O.N.** and Holding,A.J.(1974). Genus II *Agrobacterium*. In bergry's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Edition , The Williams and Wilkins company, Baltimore, PP.264-267.
- Amabile-Cuevas,.F.** and Chicurel,M.E.(1992) Bacterial plasmids and gene flux.Cell.70:189-199.
- Ames,P.** and Bergman,K.(1981) Competitive advantage prodived by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*.J.Bac.,148: 728-729.
- Angel,B.A.;** Hohn,B.and Tinland,B.(1998). The omega sequence of vir D₂ is important but not essential for efficien transfer of T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens*.Mol. P. Mic. Int., 11:57-63.
- Ann,M.Hirsch;** Daniela drake.; Thomas W.Jacobs; and Sharon R.Long (1985). Nodules are induced on alfalfa Roots by *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium trifolii* containin small segments of



the *Rhizobium meliloti* nodulation region. Vo: 161 No(1):223-230.

- Anwar,F;**Sharmila,P;and Saradhi, P.(2009).No more hardle: In vitro chickeae rooting and cent percent transplantation.Aus. I. Bas. and Appl.Sci., 3:2491-2496.
- Appleby, C.A.** (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Ann Rev of P Phy and P Mol Bio., 35: 443-478
- Aragao,F.J;**Vianna,G.R.; Albino,M.M. and Rech,E.(2002). Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. Crop.Sci.,42:1289-1302.
- Arencibia ,A.D;** Carmona, E.R;Tellez, P; Chan, M.T; Yu ,S.M; Trujillo L.E .and Oramas,P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp.* L) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Tra. Res .,7: 213-222
- Armstrong C.L;** Rout, J.R.(2001). A novel *Agrobacterium*- mediated plant transformation method. Int.P. Publ., 9:302 -321
- Arrese,I. C;** Becerril, J. M;Garcia, P.J and Aparcio,T. P . (1993). Denitrification in free-livng *Rhizobium meliloti* and lucerne root nodules. Plant Physiology, 11: 7-20.
- Asion ,A.M.** (1988) *Agrobacterium tumefaciens*: Chemotaxis and crop protection. Theses,Durham University England.
- Atlase,R.M.** (2010). Hand book of Microbiological Media,4th ed,Taylor and Francis Group,PP(313-314).
- Aysan,Y.** and Sahin,F. (2003) An outbreak of grown gall disease on rose caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey Plant Pathol. 52:780-789.
- Bajaj,Y.P.S.** (1998). Biotechnology for the improvement of medicinal plants.Sym . P. Bio., 457:37-45.
- Bakkou, N.** (2011) Characterization of the endsymbiotic forms of *Sinorhizobium sp.* strain NGR 234: Doctorat these, University DE GENEVE, Italie.
- Balachandar,D;**Raja,P;Kumar,K;and Sundaram,S.P.(2007) Non-rhizobial nodulation in legumes. Biot and Mol Bio.,2:49-57.
- Bano, A** and Erum, S .(2008) Variation in phytohormore, production in *Rhizobium* strains at different Altitudes of Northern areas of Pakistan.International Journal of Agriculture & Biology, 10:526-540.



- Bardakci,F.**(2001) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Markers.Turn.J. Bio.,25:185-196.
- Barry,G.F;**Rogers,S.G;Fraley,R.T.and Barand,L.(1984). Identification of a cloned cytokinin biosynthetic of gene.Proc.Nati.Acad. Sci.,81:4776-4780.
- Barrow,G.I** and Feltham,R.K.A.(2003).”Cowan and Steel’s.Manual for the identification of medical bacteria” .1 ed.,Cambridge University Press,U.K.
- Bean,S.J;**Goding,P.S; Mullineaux, P.M and Davies,D.R.(1997) A simple system for pea transformation .P. Cell .Rep.,16:513-519.
- Bedmar,E.;** Brewin,N.J and Phillips,D.A.(1984) .Effect of plasmid PIJ008 from *Rhizobium leguminosarum* on symbiotic function of *Rhizobium meliloti*.Applied & Environmental Microbiology, 47:876-878.
- Belachew,T.** (2010). Intrinsic antibiotic resistance, survival of *Rhizobium leguminosarum* strains and fixation potential of pea varieties (*Pisum sativum* L.) In southeast Ethiopia. Int. J. Mic. Res., 1: 75-79.
- Bergman,K;** Gulash; H; Hovest,D; Larosilere, R. E. and Ronco, P.G. (1988). Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway.J. Bac., 170:3249-3254.
- Beringer, J . E;** and Hopwood, D. A. (1976) Chromosomal recombination and mapping in *Rhizobium leguminosarum*. Nat .,264: 291-293
- Beringer,J.E.**(1974) R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J.Gen.Mic.,84:188-198.
- Berkum, P.V.** and Eardly, B.D. (1998). Molecular Evolutionary Systematic of Rhizobiaceae. In the Rhizobace. Klumer Academic Publishers, Netherlands.
- Bernaerts,M.J;**and Deley, J(1963). Abiochemical test for crown gal. Bac. Nat. Lon.,197:604-607.
- Bhuraneswar, T.V;** Andrew,P;Lesniak and Wolfgang,D.B. (1988). Efficiency of nodule Initiation in cowpea and soybean. P. Phy Sci.,86:1210-
- Bini, F;** Kuczmog, A.; Putnoky, P.; Otten, L; Bazzi, C; Burr, T and Szegedi, E. (2008) Novel pathogen-specific primers for the



detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis*, 47(3):1-9.

- Bizet, C.,** and Bizet, J. (1995). In-vitro susceptibility of *Ochrobactrum anthropi* compared to those of *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans*, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xyloxydans* and *Boettlichia bronchiseptica* to 35 antimicrobial agents including 17 beta-lactams. *Pathol. Biol.*, 43:258-263
- Black, R.C.;** Gary, A.K.; and Andrew, N.B. (1986). The initiation of auxin autonomy in tissue from Tobacco plants carrying the auxin biosynthesizing genes from the T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.*, 80:145-151.
- Block, E.D.;** Herrera-Estrella, M.L.; Van Montagu, M.; Schell and Zambryski, P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *J.EMBO.*, 3:1681-1689.
- Bohcompagni, E.;** Trinchant, J.C.; Spennato, G.; Poggi, M.C and Le Rudulier, D. (2003). The *sinorhizobium mililoti* glycine betaine biosynthetic genes (*betCba*) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. *Mol. plant-Microbe Int.*, 16:709-719.
- Boisson-Derrier, A.;** Chaband, M., Garcia, F; Becard, G; Rosenberg, C. and Barker, D.G. (2001) . *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant Microbe Interact. Int.*, 14,695-700.
- Bolton, G.W.;** Nester, E.W. and Gordon, M.P. (1986). Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Sci.*, 232:983-989.
- Bond, J.E.** and Webb, K.J. (1989). Regeneration and analysis of plant from stolon segments of *Trifolium repens* (White Clover). *Plant Sci.*, 61:119-125.
- Bono, J.J.;** Gressent, F.; Niebel, A.; Climore, J.V.; and Rnajeveva, R. (1996). Biochemical characterization of nod factor binding sites in *Medicago* roots cell suspension cultures. In: *Biology of Plant Microbe Interaction*. (eds.) Stacey, G.; Mullin, B. and Gresshoff, P.M.) International Society for, Molecular Plants Microbe Interactions, St. Paul, M.N., P. 90-104.
- Bopp, C. A.;** Brenner, F. W.; Wells, F.W. and Strockbin N. A. (1999) . *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edn, Asm Press, USA.



- Bouzar, H.;**Chilton, W.S.; Neseme .;Dessaux, Y; Vaudquin, V.; Petit, A.; Jones, J. B. and Hodge, N. C. (1995). A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors *Onficus benjamina* L. Appl. Envi. Micro.,61: 65-73.
- Bouzar,H.**and Jones,J.B.(1992). Distinction of biovar 2 strains of *Agrobacterium* from other chromosomal groups by differential acid production let .Appl.Microbiol.,15:83-85.
- Bradley, L. R;** Kim, J. S. and Mathysse, A. G. (1997). Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to Carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell associated acidic polysaccharide, J. of Bac., 179: 5372-5379.
- Bradley,D.E.**(1981)conjugative pili plasmids in Escherichah coli K-12 and Pseudomonag species,P.217-226. In S.B Levy,R.C.Clones and E.L.Koenig (ed).Molecular biology,pathogenicity gand ecology of Bacteria plasmids.plenum press, NewYork.
- Breedveld, M;** Hayo, C. J. Canter , C; Michael, B; Marten, A. P; Ludovicus, P.T;Zevenhuizeni, C. A, Wijffeiman, Alexander, J. B and Ghnder, Z. (1993). Polysaccharide synthesis in relatoin to nodulation behavior of *Rhizobium leguminsarum*. J. Bac.,175:750-757.
- Brewin,N.J.**(1998) Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In: the Rhizobiaceae . Kluwer Academic Publishers, Netherlands, PP.417-429.
- Brich,R.G.**(1997) .Plant transformation problems and strategies for practical application. Annual Review of Plant Physiology and plant Molecular Biology, 48:292-326.
- Brody,T.M;** Larner,J.; Minneman,L.P. and Nen, H.C.(1994). Human Pharmacology. 2nd ed., Mosby- year book,Inc., St. Louis, Missouri.
- Brome,S.;**Gavcia,D; Santos,A.; Cervantes,L.;Palacios,R and Romer, D. (2000) In *Rhizobium etili* symbiotic plasmid transfer, nodulation competivity and cellular growth require interaction among different replicans.Plasmid, 44:34: 34-43.
- Bromfield, E.;**Sinha, I.B .and Wolynetz, M.S. (1986). Influence of location, host cultivar,and inoculation on the composition of haturalized population of *Rhizboium meliloiti* in *Medicago sativa* nodules. Appl Environ



- Broothaerts, W.** (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433, 629-633.
- Brown, A. E.** (2007). "Benson's Microbiology Applications, Laboratory Manual In General Microbiology" 10th ed. McGraw-Hill's Com., Inc., U.S.A.
- Bryan D. Mckersie;** Yurong, C.; Mitchel ,D.; Beus, S.; Bowley, R.; Chris ,B.; Dirk ,I.; Kathleen, D'. H and Johan, B. (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic Alfalfa (*M. sativa*). *Plant Physiol.*, 103:1155-1163.
- Burr, T. J.;** Bazzi, C.; Sulf, S; Otten, L. (1998). Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.*, 82: 1288-1297.
- Burr, T. J.;** Otten, L. (1999). Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 53-80.
- Bush , A.L.** and Pueppke, S.G. (1991). A rapid and efficient new assay for determination of three biotypes of *Agrobacterium tumefaciens*, *Appl. Microbol.*, 13:126-129.
- Caetano-Anolles, G.;** Wall, L. G., DeMicheliy, A.T.; Macchi, M. M.; Baucr., W. and Favelulees, G. (1998). Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, 86: 1228-1233.
- Canfield, M.L.** and Moore, L.W. (1991). Isolation and characterization of opine-utilizing strains of *Agrobacterium tumefaciens* and fluorescent strains of *Pseudomonas spp* roots stock of Maios. *Phyto .Pathology*, 81, 440-443.
- Cangelosi, G.A.;** Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W. (1990) .Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembran signal protein proceedings .National Academy of Sciences, 87:6708-6712.
- Cardenaus, L.;** Dominguez, J.; Quinto, C.; Lopez-Lava, L Lugtenber, B.; Spaink, H; Rademaker, G; Haverkamp, J. and Thomas-Oates, J. (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo- chitin oligosaccharide, nodulation signals from *Rhizobium etli*. *plant Mol. Biol.*, 29: 453-464.
- Carpenter, P.L.** (1977) *Microbiology*, 4th ed, W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, P.209.
- Catoira, R.;** Antonius, C.J; Fabienne ,M.; Christine ,G; Varma, P.; Douglas, C; Jean, D and Clore, G. (2001). The hel- gene of



- Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling. *Development*, 128:1507-1518.
- Cevheri, C.;** Cigdem, K and Esat, C. (2011). Fungicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Vicia palaestina*. *African Journal of Biotechnology* ,10: 2423-2429.
- Chakrabart, Y.R.;** Viswakarmas, N; Bhat, S; Kirti, B and Chopra, V.L. (2002). *Agrobacterium* – mediated transformation of Cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic Cauliflower. *J. Biosci*, 27:495-502.
- Chang, C.H.** and Winans, S.C (1992). Functional role assigned to the periplasmic, linker and receiver domains of the *Agrobacterium tumefaciens* *Viva* protein. *Journal of Bacteriology* 174:7033-7039.
- Chen ,F.C.;** Show- Huey, H; Shio, T. H; Ming- Chao, C. and Chien- Yih, L. (1999). Leaf, stem and crown galls on perennial sasters caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 40:237-242.
- Chen, W.M.;** Laevens, S.; Lee, T.M; Coenye, T.; Devos, P.; Mergeay, M.; Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwansensis* sp. Nov, Isolated from root nodules of *Mimosn* species and sputum of cystic fibrosis patient. *Int. J. of systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1729-1735.
- Chen, W.M.;** De F, James, S.M.; Elloit, G.N.; Lin, K.Y.; Chou, J.H. ; Sheu, S.Y. ; Chockaert, M. and Spretn, J.I. (2007). *Burkholderia nodosa* sp. isolated from root nodules of woody brazilian legumes *Miamosa Bimueronata* and *Misosa Scabrella*. *Int. J. Systematic Evolutionary Microbiology*, 57:1055-1059.
- Cheng, M.;** Fry , J.; Pang ,S.; Zhou, H.; Hironaka, C .M.; Duncan, D .R.; Conner, T.W. and Wan, Y. (1998). Genetic transformation of Wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.*, 115: 971-980.
- Cheng, M.;** Fry Je, P. S., Zhoul, S.; Hironaka, C.; Duncan ,D.R.; Conner, T.W.L.; Wany, Y. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Physiol.* 115:971-980.
- Cho, H.;** Pinto, U. M. and Winanse, S.C. (2009). Transsexuality in the rhizosphere: quorum sensing reversibly converts *Agrobacterium*



- tumefaciens* from phenotypically female to male. J. bacteriol., 191, 3375-3383.
- Cho, K.;** Clay, FuQua; B.; Martin, S.; and Stephen, C.W. (1996). Identification of *Agrobacterium tumefaciens* gens that direct the complete catabolism of Octopne. J. of Bac., 178: 1872-1880.
- Chou, W.** and Wang, C. Y. (1998). Effect of ethylene callus differentiation of alfalfa (*Medicago sativa* L) .Weed .Sci .Bull., 19:53-62.
- Christon, P.** (1997). Biotechnology applied to grain legume, Field Crop. Res., 53:83-98.
- Chung, S.;** Manjusha ,V. and Tzvi ,T.(2005). *Agrobacterium* is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. Trends in Plant Science, 5:415-425
- Cohn, J.;** Day, R.B. and Stacey, G.(1998). Legume nodule organogenesis. Trends Plant Sci., 3:105-110.
- Collee, J.G.;** Faser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A.(1996). "Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology" 14th ed., Churchill Living Stone Inc., New York.
- Collier, R.;** Fuchs, B; Walter, N; Kevin ,L.W. and Taylor C.G. (2005). Ex vitro composite plants: an inexpensive, Rapid method for root biology. Plant J., 43:449-457.
- Collins, A.** (2001). *Agrobacterium tumefaciens* <http://www.cals.ncsu.edu/course/PP728/Agrobacterium/Alyssa-collins/profile.Htm>.
- Conn, H.J.** (1942). Validity of the genus *alcaligenes*. J. of Bacteriology, 44:353-360
- Crea, F.;** Bellucci, M.; Damani, F and Arcioni, S. (1995). Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. CV. Adriana). Euphytical, 81:151-155.
- Crespi, M.** and Galvez, S. (2000) .Molecular mechanisms in root nodule development. J. of Plant Growth Regulation, 19: 155–166.
- Cubero, J.** and Lopez, M.M. (2001). An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. J. Plant Pathol., 107: 757-760
- Dale, J.M.** and Park, S.F.(2004). Molecular Genetics of Bacteria. 4th ed, John Wiley and Sons, Ltd. Chichster, England.
- Daneil, P.M.;** Marica, L.; Socorro, M.; Jose, A.; Jose, O.; Fernando, C. and Juan, S.(2006). The relaxase of the *Rhizobium etli* symbiotic Plasmid shows hie site cis-acting preference. J. Bacteriol., 188:7488-7499.



- Debasis, P.;**Dalia, V. and Paramjit, K. (2006). *Agrobacterium*-Mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. Current Science., 91: 307-317.
- Debilly,F.;**Grosjean,C.;May,S; Bennett,M. and Cullimore,J.V.(2001). Expression studies on auxI-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development.Mol.Plant Microb.Interact.,14:267-277.
- Deblaere, R.;** Bytebier, B.; Greve, H.; Deboeck, F.;Schell, J.; Van-Montagu ,M.and Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucleic acids research ,13: 4777-4788
- Decre, D. ;** Verdet, C. ; Rashine, I. ; Blanchard , H. ; Burghoffer, B. ; Philippon, A. ; Sansonle-person, M. ; Petit , J. C. and Arlet, G. (2002) . Characterization of Cm^y-type β -lactamase in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in 4 hospitals in the paisian area. J. Antimicrobial Chemotherapy.
- Delea,J.C.** (1975). Molecular Biology fo the Genus *Agrobacterium*. (Genetic Manipulation with plant material) ed. By L. Ledoux, Plenum press. New York.
- Demezas, D.H;**Readon, T.B;Strain, S.R.;Watson, J.M & Gibson, A. (1995). Diversity & genetic structure of natural opulation of *Rhizobium leuменosarum* bv.trifoli isolated from tifolium subterraneum L.Mol.Ecol.4:209-220.
- Deng ,W.;** Chen, L.; Wood, D.;Metcalf, T.; Liang, X.; Gordon, M.P.; Comai, L.and Nester ,E.W. (1998 a).*Agrobacterium* Vir -d2 protein interacts with plant host cyclophilins . Proc. Natl. Acad. Sei. USA., 95:7040-7045.
- Deng,W.**and Nester,E.W.(1998b) .Determinants of Host Specificity of *Agrobacterium* and Their Function. In the Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, P. 321-338
- Devlin,R.M.** and Witham,F.(1983). Plant Physiology. 4th ed. Wadsworth Publishing Company Belmont California.
- Diaz, C. L.;** Melchers, L. S; Hooykaas, P. J; Lugtenberg, B. J. and Kijhe, J. W.(1989). Root lectin as a determinant of host – plant specificity in the *Rhizobium* – legume symbiosis. Nature, 338:579-581.
- Diaz,C.L.;** Spaink, H.P. and Kigne, J.W. (2000). Heterologous rhizobial oligosaccharids and chitinoligomers induce cortical cell



divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13:268-276.

Dickstein, R.; Scheirer., D. C.; Fowle, W. H. and Ausubel, F. M. (1991). Nodules elicited by *Rhizobium meliloti* heme mutants or arrested at an early stage of development, *Mol. Gen. Genet.*, 230:423-432.

Didonato, A.; Nigris, M. D; Rusoo, N.; Di , B.S. and Alessio, G. (1993). A method for synthesizing genes and CDNAS by the polymerase chain reaction. *Annu. Biochem.*, 212:291-293.

Dilworth, M.J.; Taiwan, R.P.; Reeve, W.G. and Glenn, A.R. (2000). Legume root nodule bacteria and acid pH. *Science Progress*, 83, 357-389.

Dir, P. V.; Collins, G.B. and Ghabrial, S A. (1996). Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep.*, 15:746-750.

Ditt, R.F.; Nester, E.W and Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 10954-10959.

Dodds, J.H. and Robert, L.W.I. (1985). Experiments in plant Tissue Culture. Cambridge Univ, Press. London

Dogan, D.; Khawar, K, M and Sebattin, O. (2005). *Agrobacterium* medicated tumor and hairy root for motion from different explant of lentils derived from young seedlings. *Int. J. of Agriculturs and Bio.*, 6:1019-1025.

Dominguez- Ferreras, A.; Perez-Arnedo, R.; Becher , A.; Olivares , J.; Soto, M .J. and Sanjuan , J. (2006). Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid sym B for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bact.*, 188: 7617-7625.

Don, J.B.; Noel, R.; Krieg, J.; Staley , T. and George, M.G. (2005). *Berge's Manual* ® of systematic bacteriology., Volume: 2, USA.

Dong, L.C. and Sun, C.W. (1992). Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 82:434-339.

Doty, S.T.; Yu, N.C.; Lundin, J.I.; Heath, J.D. and Dster, E.W. (1996). Mutational analysis of the input domain of the Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. of Bac.*, 178:961-970.

Dowine, J.A. (1998). Function of rhizobial nodulation genes. Kluwer Academic Publish , The Netherlands, P:387-402.



- Du, N.;** and Pijul,P.(2009). *Agrobacterium*-mediated transformation *Fraxins pennsylvanica* hypocotyls and plant regeneration *in vitro* .Cellular and Development Biology- Plant ,45:429-434.
- Du,S.;**Erick,S. L.;and Bowley,S.(1994). Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep.,13:330-334.
- Dunican,L.K.;** Ogara,F and Tierney,A.B. (1976). Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University. Press-Cambridge. P:77-90.
- Dunican,L.K.;** and A.B. Terney. (1974). Genetic transfer of nitrogen fixation from *Rhizobium trifolii* to *Klebsiella aerogenes*. Biochem. Biophys. Res. Commun.,57: 52-72.
- Eardly,B.D .;**Wang F.S.;Whittam, T.S .and Selander, R.K .(1995). Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the the common bean *Phaseolus vulgariss* . Apptl. Environ. Microbiol., 61:507-512.
- Eckhardt, T.** (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid, 1:584-588.
- El- Turki,A.**(1995) Microbiological Studies on Symbiotic Nitrogen Fixation between *Rhizobium* and Alfalfa in Some Soils of Saudi Arabia.M.SC. Thesis,.,Agric.King Sad Univ.,Saudi Arabia.
- Engelke,T.;**Jording, D.and Kapp, P. A. (1989). Identification and sequence anaylsis of the *Rhizobium meliloti* dctA gene encoding the c4-dicarboxylate earrier. J.Bacteriol., 171: 5551-5560.
- Ehrlich,G.D.** and Greenberg,V.B.(1992). The PCR technique: DNA sequencing .Eaton Publishing company.
- Erlich,H.;** Gelfand and Shinky,J.J.(1991) Recent advances in the polymerase chain reaction . Science ,252:1643-1651.
- Erum, S.** and Bano, A .(2008) .Variation in phytohormore, production in *Rhizobium* strains at different altitudes of northern areas of Pakistan.Int. J. of Agriculture and Biology, 10:526-540.
- Estrad-Navarrete ,G.;** Xochiti, A. A.;Juan-Elias ,O.;Claudia, D.C; Olivia, S;Ehriqu, M.; Gabriel, G.;Nayeli, S.; Jorge, A.; Carmen, Q.;Dongxe,L.; Peter,M.G; and Feder, I. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Physeolus sp* A tool for functional .Genomics, 19: 1385-1393.



- Fahraeus, G.** and Ljungren, H.(1959). The Possible significance of pectic enzymes in root hair infection by nodule bacteria. *Physiologia Plantarum*, 12:145-154.
- Fahraeus, G.**(1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass slide technique. *J.Gen. Microbiol.*, 16:374-381.
- Fentahun, M.;** Akhtar, M. S. and Diriba, M. (2013). Isolation and characterization of nitrogen deficit *Rhizobium* isolates and their effect on growth of haricot bean. *Aademic Journal*, 8 :5942-5952.
- Fike, J.H.;** Parrish ,D J; Wolf,D.D; Balasko,J.A Green,J; Rsnake,M; and Reynolds,J.H.(2006). Switchgrass production for the upper southeas- tern USA: Influence of cultivar and cutting frequency on biomass yields. *Biomass Bioenergy*, 30:207-213.
- Fischer, H M.**(1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia .*Micro. Rev.*, 58: 352-386.
- Flowers, W** and Vaillancourt, L. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum sublineolum* .*Current Genetics.*, 48:380-388.
- Fraley, R.T.;** Rogers, R.B.; Horch. P. R .; Sanders, S.P.; Flick, S.P.; Adams, M.L.; Brtner, L. A.; Brand, C. L.; Fink, J.S.; Fry, G. R.; Galvppi, S.P.; Goldbery,N.L. and Hoffmann , S .(1983). Expression of bacterial genes in plant cells.*Proc. Natl.Acad.Sci., USA.*, 80:4803-4807.
- Fraysse, N.;** Lindner, B.; Kaczynsk, Z.; Shaypova, L.; Holst,O.; Niehaus, K., and Poinot,V.(2005). *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 produces a low-molecular mass capsular polysaccharide that is abonopolymer of 3- deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid arboring a phospholipid anchor.*Glycobil.*,15:101-108.
- Freddi, A.;** Hammerschlag.; Richard ,H.Z.;Umedi, L.; Yadara,S. H. and Pety, G.(1997). Effects of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefacines* from Apple leaf explants and on shoot regeneration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122: 758-763.
- Fullner, K.J.;** Cano,L.J.and Nester,E.W. (1996). Pilus assembly by *Agrobacterium* T- DNA transfer gene. *Science*, 273: 1107- 1109.
- Fure-Chyi, C.;**Shiow-Huey ,H.;Shio-Tau, U.;Ming-Chao ,C. and Chien-Yih ,L.(1999). Leaf,stem and crown galls on perennial asters



caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sci.,40:237-242.

Furuya, N.; Shimokusuzono, y.; Nakamura, K. N.M.; Takeshita, N. M. and Takanami, K.M.Y.(2004). Crown gall of tobacco caused by *Agrobacterium tumefaciens* Biovar I in tobacco fields. J. Gen. Plant Pathol., 70:39-44.

Gamborg,D.L.; Miller,R.A.and Ojima, K.(1968). Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Exp Cell Res.,50:151-158.

Garcia,J.; Carcia,A.;Jacques, H. and Rob, G. (1986). Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* cells with an antibiotic resistance gene using Ti- plasmid- derived vector.Plant Science,44:47-46.

Garcia-Plazaola,J.E.; Hernandez.; Bacerry J.M and Arrese-Igor,C.(2000). Long term effects of nitrate on lucerne (*Medicago sativa* L) nitrogen fixation in not influenced by the denitrification states of the microsymbiot.Plant and Soil, 26:139-145.

Garibyan L. and Arashi , N. (2013) Polymerase chain reaction. Investigative Dermatology, 133: 1-4.

Gray,K.; Pawell,N. G.Hommes,J. K.;Linda ,A.;Castle and Roy O,M.(1988). Inucible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics. Molecular Plant Microbe Interactions, 1:235-242.

Geetha,S.P.; Nirmal, B. K.; Rema,J.; Ravindran, P. N. and Peter, K. V. (2000). Isolation of protoplasts from cardamom (*Elettaria cardamomum*) and ginger(*zingiber officinale* Rose). J. of Spices and Aromatic Crops, 9 (1): 23-30.

Gelvin, S.B. (1990).Crown gall disease and hairy root disease. Plant Physiol., 92:281-285.

Gepts,P.; Beavis,W.D.;Brummer,E.C.;Shoemaker,R.C.;Stalker,H.T.;Weeden,N.F and Young,N.D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics conference.Plant Physiol.,137:1228-1235.

Germia,R.A.; Cavaignae,S.; Zorrequieta,A.; Toro,N.; Olivares,J.and Ugalde,R.A.(1987). A *Rhizobium meliloti* mutant that forms in effective pseudo nodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form B(1 -2) gluca.J.bacteriol.,169:880-884.

Goldmann,A. (1977). Octopiae,Nopaline dehydrogenases in crown-gall tumors. Plants Science Letters, 10:49-58.



- Gongshe, L.** and Fuxiong, W. (2000). Bud regeneration by suspension culture of sunflower. *J. Plant Bio.*, 49:212-216.
- Gonzalez, R. G.;** Sanchez, D.S.; Guerra, Z.Z; Campos, J. M.; Alina ,L. Q.; Rolando, M. V.; Ariel, D.A.; Karla, Q. B. and Peter, D S.C. (2008). Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars Asia pacific. *J. of Molecular Bio and Biot.*, 16(2): 25-33.
- Goodner, B.;** Hinkle, G.; Gattung, S.; Miller, N.; Blanchard, M.; Quorollo, B.; Goldman, B. S.; Cao, Y.; Askenazi, M.; Halling, C.; Mullin, L.; Houmiel, K.; Gordon, J.; Vaudin, M.; Iartchouk, O.; Liu, F.; Wollam, C.; Allinger, M.; Doughty, D.; Scott, C.; Lappas, C.; Markelz, B.; Flanagan, C.; Crowell, C.; Gurson, J. and Lomo, C. (2001). Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *J. Science*, 294 (5550):2323-2328
- Gouka, R.J.;** Gerkc; Hooykaas, P.J.; Bund, C.K.P Musters, W.; Verrips ,C.T. and Groot, M.J.A. (1999). Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens* mediated homologous recombination. *Nat. Biotechnol*, 17: 598-601.
- Graham, P.H.** (2008). Ecology of the root nodule bacteria of legumes. in: Dilworth. M.J., James. S.K., Sprent J. I., Newton, W. E. (eds.) Nitrogen- Fixing leguminous symbioses. Springer. Dardrecht. The Netherlands, PP.23-43
- Grant, M.E.** and Fuller, K.W. (1968). Tissue culture of root cells of *Vicia faba*. *J. EXP. Bot.*, 19:667-680.
- Gray, K.;** Pawell, N. G.; Hommes, J.; Kuo, L. A.; Castle and Roy, O.M. (1988). Inucible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. 1(6):235-242.
- Groot, M.J.;** Bundock P.; Hooykass , P. J. and Beijersbergen A. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechol.*, 16: 839-842.
- Gubler, M.** and Hennecke, H. (1988) Regulation of the fixA gene and fixBC operon in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol*, 170: 1205-1214



- Glash, M.;** Ames, P.; Larosiliere, R.S. and Bergman, K. (1984). Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 149-152.
- Guo, X.;** Flores, M.; Mavinguip, F.; Hernandez, G.; Davila, G. and Palacios, R. (2003). Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti* novel genomic architecture. *Genome Res.*, 13:1810-1817.
- Gustavo A.;** Joel, Gonzalez, C.; Roberto, V.P. and Camilo, A. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1:1-16.
- Guyon, P.;** Chilton, M. D.; Petit, A. and Tempe, J. (1980). Agropine in "Null-type" Crown Gall Tumors: evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:2693-2697.
- Hacene, B.;** DJacovi, D.A.; Zovlikh, A. K; Jeffrey, B; Jone, M. T.; Annlk, P. and yves, D. (1993). Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *American Society for Microbiology*, 59, 1310-1316.
- Hacene, B. and Larry, W.;** M. (1987). Isolation of different *Agrobacterium* biovar from a Natural Oak Savanna and Tallgrass Prairie. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:717-721.
- Hahn, F.E.** (1976). Elimination of plasmids from bacteria. *Antibiotics and Chemotherapy*, 20, 196-201.
- Hai-Baozhang;** Lian-Hui, W. and Lian-Hui, Z. (2002). Genetic control of Quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS.*, 99 :4638-4643.
- Haliloglu, K.;** Stephen, P. and Baenziger, A.M. (2004). Genetic transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L) anther culture derived embryos by electroporation. *Biotechnol. and Biotechnol.*, 2:62-68.
- Handberg, K. and Stouyaard, J.** (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetic. *The plant Journal*, 2:487-496.
- Hanmadag, S. E.;** Joan, P. L. and Stephen, K. F. (1979). R-Plasmid mediated chromosomal gene transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriology*, 139 (1): 280-286.
- Hansen, G. C.** (2000). Evidence for *Agrobacterium* induced a potatosis in Maize cell. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13:649-657.



- Hansen,G.** and Wright,M.(1999). Recents advances in the transformation of plants. Trends in Plant Sci., 4:226-231.
- Harrison,M.J.;** Dewber,G.R.and Liug J (2002) A phosphate transporter form *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by *Arbuscular mycorrhizla* Fungi. Plant Cell, 14:2413-2429.
- Hartmann, H.T.;** Keter, D.E.; Davies, F.T. and Geneve , R.L. (2002). Plant Propagation Principles and Practice. 7th ed. Prentice-hall Upper Saddle River, N. J.
- Hartwell,L.;** Hood,L.; Glodberg,M.L; Reynold,A.E; Silver,L.M and Vers,R. C.(2000). Genetics from genes to genomes. The McGraw – Hill companies, Inc,Boston,U.S.A.
- Hatterman,D.R.;** and Stacey, G.(1990) .Efficient DNA transformation of *Bradyrhizoiium japonicum* by electroporation. Appl. Environ. Microbiol., 56: 833-836.
- Heggo,A.M.** and Barakan,F.N. (2004). Effects of inoculum densities of *Rhizobium meliloti* and differents rates of nitrogen fertilizers on Alfalfa plants grown in calcareous soil. J. King Saud Univ., Agri. Sci, 2 :161-170.
- Hellens,R.;** PhilifMulliaeux. and Harry, K.(2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti Vectors trends in plant. Science, 5(10): 446-451.
- Herrera- Cervera,J.A.;** sanjuan-Pinilla, J. M; Olivares. and Sanjuan, J. (1998). Cloning and identification of conjugatve transfer origins in the *Rhizobium meliloti* genome,J.bacterio.,180: 4584-4590.
- Herrera- Estrella,A.;** Van Montagu,M.; and Wang,K (1990). A bacteril peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino terminal protion of *Agrobacterium* Vir D₂ protein directs- the B – Galactosidase Fusion protein into tobacco nuclei proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 87:9534-9537.
- Herrera Estrella,L.** (2005). Transgenic plants: an historical perspective. Mehtods Mol. Biol.,86-95
- Herrera-Cervera,J.A.;** Olivares,J.; and Sanjuan,J. (1996). Ammonia inhibition of plamid PRme GR4a Conjugal transfer between *Rhiobium meliloti* stains. Appl.Environ.Microbiol.,62:1145-1150.



- Higgins, S.C.;** Hyyde, S.C.; Mimack, M.M; Gileadi, V.; Gill, D.R. and Gallagher, M.P. (1990). Binding protein dependent transport systems. *Journal of Bioenergy and Biomembranes*, 22:571-592.
- Higgins, C.S.;** Murtough, S.M.; Williams, E.; Himo, S.J.; Payne, D.J. Russell, A.D.; and Walsh., T.R. (2001). Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria, *Clin Microbiol. Infect.*, 7:308-315.
- Hindson, S.;** MCELroy, A.R. and Potelance, C. (1998). Media and genotype effects on the development and conversion of somatic Alfalfa (*Medicago sativa* L) embryos. *In vitro cellular and Development Biology, Plant*, 34(3):181-184.
- Hiroki, N.;** Toshiki, C.; Kenichi, K.; Akihiro, S; Shiro, H and Nikiko, A. (2008). Transposon mediation allows symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to become a symbiosis island *Agrobacterium* and *Rhizobium*.. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54: 107-118.
- Hirsch, A.M .** (1992). Development biology of legume nodulation . *New Phytol.*, 122: 211-237.
- Hirsch, A.M.H.;** Daniela, A; Thomas, W; Jacobs and Sharon, R.L. (1985). Nodules are induced on alfalfa roots by *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium trifolii* containin small segments of the *Rhizobium meliloti* nodulation region. *J. Bacteriol.*, 161:223-230.
- Hoekema, A.;** Hirsch, P.R.; Hooykaas, P.J. and Schilperoort, R.A. (1993) .A binary plant vector strategy based on separation of the vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature*, 303:179-180
- Hohn, B.** and Korn, D. (1969). Co-segregation of sex factor with the *Escherichia coli*. Chromosome during curing by acridine orange. *J. of Molecular biology*, 45:385-395.
- Holt, J.G.;** Krieg, N.R.; Sneath, P.H. ;Slaley, J.T. and William, S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th ed. Williams and Wilkins Baltimors, Netherlands. html, cited 22 Jan 2009.
- Hongqing, M.;** Li, L.; Xiaoying, H.; Xiaoping, P. and GuoJiang, W. (2012). Genetic transformation and over expression of a rice Hd3a induces early flowering in saussurea involucrate Kar. Maxim. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106: 363-371.



- Hood, E.E.;** Helmer, G.L.; Fraley, R.T. and Chilton, M.D. (1986). The hyper virulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTi bo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168: 1291-1301.
- Hoori, F.;** Ehsanpour, A.A and Mostajeran, A. (2007). Comparison of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Pakistan J. of Biological Sciences.* 10: 481-485.
- Hooykaas, P.J.;** Klapwijk, P. M.; Nuti, M. P.; Schilperoort, R. A. and Rorsch, A. (1977). Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to a Virulent *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Explanta. Journal of General Microbiology*, 98: 477-484.
- Hooykaas, P. J.;** Shijdewint, F.G and Schilperoort. R. A. (1982). Identification of the sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to and expression in other Rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid*, 8:73-82.
- Hooykaas, P.J.;** Van Brussel, A.A.; Dulk-Ras, H.; Van- Slogteren, G.M. and Schilperroot, R.A. (1981). Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expression in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 91:351-353.
- Hooykass, P.J.J.** and Shilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *plant Molecular Biology*, 19:15-38.
- Hopkins, A.A.;** Voge, K.P; Moore, K.J; Johnson, K.D and Carlson, I. T. (1995). Genotypic effects and genotype environment interactions for traits of elite switchgrass populations. *Crop Sci*, 35:125-131.
- Horrath, B. C.;** Bachem, J. W.; XSchell, J. and Kondorosi. A. (1987). Host specific regulation of nodulation gene in *Rhizobium* is mediated by a plant signal, interacting with the nod D gene product. *EMBO J.* 6:841-848.
- Hussain, A.;** Zia, M. and Mirza, B. (2007). Cytotoxic and antitumor potential of fagonia, *Critical Turk J. Biol.*, 31:19-24.
- Hwang, H.H.** and Gelvin, S.B. (2004). Plant proteins that interact with Vir B2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *The Plant Cell*, 16:3148-3167
- Hynes, M. F.;** Simon, R.; Muller, P.; Niehaus, K.; Labes, M and Puhler, A. (1986). The two megaplasmids of *Sinorhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. gen. Genet.*, 202; 356-362.



- Ibrahimm, A.M.M.;** Mostafa, M.H.; Elmasry and Elnaggar , M.M. A.(2005).Active biological materials inhibiting tumor initiation extracted from marine algae . Egypt J. Aqua .Res., 31:146-155.
- Islam,R.;**Malik,T;Husnian,T.;and Riazudding,S.(1994). Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium* Chickpea interaction .Plant Cell Reports., 13:561-563.
- Jabeen, N.;** Huma, G.;Syed ,A. S.;Mushtaq, H.; Munnaza, A.and Shelkh, A. R.(2009). Biophysical chemical characterization of Bactericoin (S) from indigenous isolated *Agrobacterium radiobacter* .NA6.pak.J.Bot.,41:3227-3237.
- Jaiwal,P.K.** and Singh. (2003). Focus on biotechnology In: Improvement strategies for leguminosae biotechnology,Plant Sci., 10:329-335.
- Jefferson,R.A.;**Kavanag,T.A and Bevan,M.W.(1987). Gvs fusions β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.EMBO.J., 6:3901-3907.
- Jelenic, S.;** Peter, T.; Mitrikeski, D. P. and Jelaska, A. (2000). *Agrobacterium* mediated transformation of bread bean *Vicia faba* L. Food Technol and Biotechnol., 38: 167-172.
- Jensen, M.A.,**Webster.J.A.,and Straus, N. (1993) Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms.Applied and Environmental Microbiology, 59:945-952.
- Jin,S.S.;** Prusti, R.K; Roitsch, T.;Ankenbauer, R. G.and Nester, E. W. (1990 a). The Vir G protein of *Agrobacterium tumefaciens* is phosphorylated by the atophosphorylated vir A protein and this is essential for its biological activity. Journal of Bacteriology, 172:4945-4950.
- Jin,S.S.;**Roitisch, T.; Christie, P.J. and Nester, E.W.(1990 b). The regulatory Vir G protein specifically binds to cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes.Journal of bacteriology ,172:531-562.
- Jones, J.D.G.;** Shlumukov, L.;Carland, F, English ,J.; Scofield, S.R.; Bishop. G.J.and Harrison, K. (1992). Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. Transgen. Res., 1:285-297



- Jones, A.L.;** Lal, E.M., Shirasu, K. and Kado, C.I. (1996). Vir B₂ is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmid. *Journal of Bacteriology*, 178:5706-57112.
- Jordan, D.C.** (1984). Family III: Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL. In: Krieg, N.L., (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, B., M. D., USA, 1:234-256.
- Kaiser, B.N.;** Finngar, P.M.; Tyerman, S.D.; Whitenend, L.F.; Bergersen F.J. and Day, D.A. (1998). An ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science*, 281:1202-1206.
- Karthikeyan, A.S.;** Sarma, K.S and Veluthambi, K. (1996). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Vigna mungo* L Hepper. *Plant Cell Rep.*, 15:328-331.
- Kawaguchi, A.;** Hiroyuki, S.; Koujiinoue, H. N. (2005). Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium biovar 3* strains. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71:541-59.
- Kazuya, K.;** Shinji, Y.; Kei, S.; Katsuyuki, T.; Kazuki, M and Katsunori, S. (2009) Construction of disarmed Ti plasmid transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium species*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 10:1856-1858.
- Keeney, D.R.** and Bremner, J. M. (1966). Comparison and evaluation of laboratory methods of obtaining and index of soil nitrogen availability. *Agronomy J.*, 58:498-503.
- Kelly, B.A.;** Kado, C.I. (2002). *Agrobacterium* mediated T-DNA transfer and integration into the chromosome of *Streptomyces lividans*. *Mol. plant pathol.*, 3:125-134.
- Kerr, A.** (1969). Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* and related species. *Aust. J. Boil. Sci.*, 22:111-116
- Kerstens, K.** and Deley J. (1984). *Agrobacterium* conn 1942. In: Kreig N.H., Holt J.G. (eds.) *Berey's Manual of Systematic Bacteriology*, 19 :244-254 Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Khawar, K.M.;** Sancak, C. and Ozcan, S. (2001). Transformation of lentil using LBA 4404 strain of *Agrobacterium tumefaciens*. 41. congress on biotechnology. Supreme council of Sciences Damascus Syrian Arab Republic., 141-115.



- Khenuja, S.P.S.** and Kumar, S. (1988). Isolation of phages for *Rhizobium meliloti* Ak631. Indian J. Exp. Biol., 26:665-667.
- Kiani, B.H.;** Nailasafdar., A. M. and Mirza, B. (2012.) Comparative artemisinin analysis in *Artemisia dubai* transformed with different *Agrobacterium* harbouring rol ABC genes. J. Omics, 5: 386-391.
- Kim, B.** H. and Gadd, G. M. (2008). Bacterial Physiology and Metabolism., Cambridge Univ. Press, New York.
- Kishinevsky, B.D.;** Sph, D.; Sen, D. and Yang, G. (1996). Diversity of rhizobia isolated from various *Hedysanm species* plant and soil. Dev. Biol. Plant, 186:21-28.
- Kiyokawa, K.;** Shinji, Y.; Kei, S.; Katsuyuki, T.; Kazuki, M. and Katsunori, S. (2009). Construction of disarmed Ti plasmid transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium species*. Appl. Environ. Microbiol., 10:1856-1858.
- Klee, H.** (1984). Nucleotide sequence of the *tms* genes of the PTIA6NC octopine Ti plasmid: Two genes products involved in plant tumorigenesis Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81: 1728-1732.
- Ko, T.S.** and Karban . (2004). Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*- mediated transformation of immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L Merrill). *In vitro* cell Dev. Biol. Plant, 40:552-558.
- Kobayashi, H.** and Broughton, W.J. (2008). Fin-tuning of symbiotic genes in Rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. In Dilworth, M.J., James E.K., Sprent, J.I., Newton, W.E (eds.) Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses. Springer, Dorecht, The Netherlands, PP 117-152.
- Kondorosi, A.;** Kondorgi, E.; Pankhurst, C. E.; Broughton, W. J. and Bauflav, Z. (1982). Mobilization of *Rhizobium meliloti* megaplasmid curing nodulation and nitrogen fixation genes into other *Rhizobium* and *Agrobacterium*. Mol. Gen., 188:433-439.
- Kondorosi, A.;** Vineze, E.; Johnston, A. W.B. and Beringer, J.E. (1980). A comparison of three *Rhizobium* lineage maps. Mol. Gen., 178:403-408.
- Küçük, C.** and Cevheri, C. (2012). Tolerance of rhizobia isolated from *Trifolium species* in Southeast region, Sanliurfa, Turkey. African J. of Agricultural Research, 7: 1462-1467.



- Kumar ,A.;**Niharika, G.B.and Pornima,B.(2013). Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* from soil and optimization of Genomic & plasmid DNA Extraction, J.of Bacteriology, 1:1-4.
- Kunik, T. T.;** Kapulnik, T.Y.; Gafni, Y.; Dingwall, C.and Citovsky, V. (2001)." Genetic transformation of Hela cells by *Agrobacterium* National academy of Sceince, 98:1871-1876.
- Larry,D.;**Hodges,J. C. and Walts, R. (2004) *Agrobacterium rhizogenes* galls protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA- Binding protein Vir E₂. Microbiology, 186: 3065-3077.
- Lee, V.Q.;**Belles-Isis, J.;Dusaben ,Y. M.and Tremblay, F.M. (2001). An Improved procedure for production of white pruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Exp. Bot., 52:2089-2095.
- Lee,L.;** Huang,Y. and Chen, C.W.(1996). Two classes of ethidium bromide resistant mutants of streptomycess lividans 66. Microbiology, 142: 1041-1047.
- Lehman,C.W.;** Tmatman, J. K. and Carrol, D.(1994). I llegalitimate recombination in *Xenopus*: Charactization of end. Jound junctions. Nucleic Acid Resarch, 22:434-442.
- Lennet, E. H.;** Balow, A.; Haster, W. J and Sandom, H. J.(1985). a manual of clinical microbiology. 4thed., American Society for Microbiology, Washington. P.1051-1107.
- Lerouge,P.;** Roche, P.; Faucher, C; Maillet, F; Truchet,G;Prome,J.C.and Denaries, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by asulphated and acylated glucosamme oligosaccardie. Signal Nature, 344;781-784.
- Lessl,M.;** Balzer,D.; Pansegrau,W. and Lanka,T. (1994). Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti- mediated T-DNA transfer to plant cell. Cell, 77:321-324.
- Leung, K.;** Bruijn, F.J. and Bottomley, P.J.(1994). Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl. Environ. Microbiol.,60:416-426.
- Levin, R.A.;** Farrand, S.K; Gordon, M.P. and Nester, E. W. (1976). Conjugation in *Agrobacterium tumefaciens* in the abeence of plant tissue. J. Bacterial., 127: 1331-1336.



- Lewis, G.;** Schrive, B.; Mackinder, B. and Lock, M. (2005). Legumes of the World Royal Botanical Gardens., Kew, UK
- Lhuissier, F.G.P.;** DeRujter, N.C.A.; Sieberer, B.J.; Esseling, J.J. and Emonsa, A.M.C. (2001). Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod-factors: state of the art. *Annals of Botany*, 87:289-302.
- Lichtenstein, C.** and Draper, J. (1986). "In DNA cloning: A practical Approach", (ed.) Glover, D.M. (IRL, Oxford, Vol.2).
- Liosa, M.F.;** Xavier, G.R.; Miguel, Z. and Delecruz, F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, 45: 1-8.
- Lloyd, B.** and McCown, D. (1980). Commercial feasible micro propagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc.*, 30:421-427.
- Liu, H.K.;** Cayang and Wei, Z.M. (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Soybean using an embryonic tip regeneration system. *Planta*, 219:1042-1049.
- Long, S.D.** (1996). *Rhizobium* symbiosis: Nod Factors in perspective. *The Plant Cell*, 8: 1885-1898.
- Long, S.R.** (1989) *Rhizobium*-Legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56:203-214.
- Lorrenz, M.G.** and Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer. *Environment Microbiol. Rev.*, 58:563-602.
- Lowry, O.H.;** Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Radad, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.*, 193: 257-265.
- Lujan, S. A.;** Guagas, M.; Ragonese, H; Matson, S. W. and Redingbo, M. R. (2007). Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *P.N.A.S.*, 104:1228-12287.
- Maeda, Y.;** Saton, M; Hardayani, S. N; Kataoka, M; Tarakagn, N and Yoshidagk, D. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolution relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.*, 307:771-784.
- Maniatis, T.;** Fritsch, E. F and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Manners, J. M.** and Way, H. (1989) .Efficient transformation with regeneration of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*



using *A.rhizogenes* and aTi Plasmid – binary vector system. Plant Cell Report,8:341-345.

- Manunory, N.;** Kondorsi, A.; Kondorosi, E. and Mergaert, P. (2008). Cell biology of nodule infection and development in diworth, M.J. James, E.K, Sprent, J. I. Newton, W. E. (eds.) Nitrogen-fixing Leguminous symbioses springer-Dordrecht, The Netherlands ,P.153-180.
- Mariotti, D.;** Davey, M.R. and Draper, J. (1984). Crown gall tumorigensis in the forage Iegume *Medicago sativa* L. Plant Cell Physiol., 25: 473-482.
- Marja , K. C.,** William, R., Horwath, B. D. and Hammock, W. (2004). \Isolation of a strain of *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) utilizing methylene urea (ureaformaldehyde) as nitrogene source .Can. J. Microbiol., 50: 167-174.
- Martinez, J.H.;** Leonard, W.H. and Stamp, L.D. (1976). Principles of Field Crop Production. Third Ed. MacMillan Publishing Co. Inc., N.Y. USA., pp. 621-644.
- Martinez-Molina, E.;** Morales, V.M. and Hubbell, D.H. (1979). Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol., 38:1186-1188.
- Maryonne, A.;** Nathlie, D.; Ferderic, D.; Fabienne, N.; Francoise, B.; Jean-Claude-Prome; Jean, D. and Georges ,T. (1994). *Rhizobium meliloti* Iipo oligo saccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic Developmental responses. The plant cell, 6: 1357-1374.
- Mariza, M.;** Beatriz, A.G.; Maria, J. V.; Carlos, A. O.; Maria, L.; Carneiro, V. (2003). Plant regeneration from protoplasts of Alfalfa (*Medicago sativa*) VIA somatic embryogenesis. Scientia Agricola, 60:683-689.
- Matheson, S. L.;** Nowak, J. and Maclen, N.L. (1990). Selection of regenerative genotypes from highly productive cultivars of alfalfa. Euphytica ,45: 105-112.
- Matthyse, G.,** Yarnall, H.A. and Young, N. (1996). Requirment for genes with homology to ABC transport system for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bacteriology , 178: 5302-5308.



- Mattysse, A.A.** (1986). Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Critical Reviews In Microbiology*, 13:281-207.
- Mattysse, A.G.** (1983). Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *Journal of Bacteriology*, 154:906-915.
- Mccullen, C.A.** and Binns, A.N. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual review of Cell and Developmental Biology*, 22:101-127
- Mekersie, B. D.**; Yurong, C.; Mitchel, B.; Stephen, R.B.; Chris, D.; Kathleen, D.; Halluin, D. and Johan, B. (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L). *Plant Physiol.*, 103:1155-1163.
- Meek, S.C.**; Carroll, K., Das., A. and Ream, W. (1996). Vir E1 protein mediates export of the single stranded DNA binding protein vir E₂ from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. of Bacteriology*, 178:1207-1212.
- Melichers, L. S.**; Maroney, M. J.; Dendulkas, A.; Thompson, D. V.; Van-vuren, H. A.; Lperoot, R. A. and Hooykass, P. J. (1990). Octopine and Nopaline strains of *Agrobacterium tumefaciens* differ in virulence molecular characterization of Vir F locus. *Plant. Mol. Biol.*, 14: 249-259.
- Mergaert, P. V.**; Montagu, M.; Prome, J. C. and Holsters, M. C. (1993). Three unusual modifications, a D-arabionose, an -N- methyl, and a carbamoyl group, are present on Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain OR 5571. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:1551-1555.
- Meyer, R.** (1974). Alternate forms of the resistance factor in proteusmerabils. *J. Bacteriol.*, 118: 1010- 1019.
- Michael, S.** and Klans, G. (1988). Transfer of the Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* into *Escherichia coli*. *J. of General Microbiology*, 134: 413-424.
- Mickelsen, P. A.**; Plorde, J. J; Gordon, K. P.; Hargisis, C. and Maclure, J. (1985). Instability of antibiotics resistance in an strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis. *J. Infect. Dis.*, 152:50-58.
- Miller, H.** (1987). Practical aspects of preparing phage and plasmid DNA: Growth maintenance and storage of bacteria and bacteriophage. *Methods Enzymol.*, 152:145-170



- Mohamed, F.M.;** Coyne,D.P.and Read,P.E. (1993). Shoot organogenesis in callus induced from pedical explants of common bear (*Phaseolus vulgaris* L). J.Amer.Soc.Hort. Sci., 118: 158-162.
- Monteiro ,M.;** Beatriz ,A. G.; Maria ,J.V.; Carlos ,A. D .and Maria, L. C. (2003). Plant regeneration from protoplasts of Alfalfa (*Medicago sativa*) VIA somatic embryogenesis. Scientia Agri., 60:683-689.
- Moore, L.w.;** Chilton ,W.W.and Canfields, M.L.(1997). Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors.App.EnvIRON.Microbiol.,63:201-207.
- Moore, L.W.;** Kado, C.I. and Bouzar, H.(1988). *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. by Schaad, N.W. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn. pp. 16–36.
- Morris,R.O.** (1988). Bacterial genes specifying cytokinin biosynthesis structure,function and control of expression pages 105-116 in: Biomechanisms regulating growth and development. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Morris, R. O.** (1986). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. Annu.Rev. Plant Physiol., 37: 509-538.
- Moulin, L.;** Muhive, A.; Dreyfus, B.and Boivin, M.C.(2001). Nodulation of legumes by the members of the beta-subclass of Proteobacteria.Nature .,411:948-950.
- Moustafa, E.;** Ball, R. and Field, T. R. O. (1969). The use of acetylene reduction on study the effect of nitrogen fertilizer and defoliation on nitrogen fixation by field-Growth white clover . Agric. Res.,12: 691-696.
- Mullis, K. B.;** Faloona, F. (1985). Specific synthesis of DNA *in vitro* a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol., 155:335.
- Murashige,E,T.**and Skoog,F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant,15:473-497.
- Muragesan, S.;** Manoharan,C. and Vijayakumar, I.(2010). Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from root nodules of some leguminous plants.Int. j. of Mac. Res., 1:92-96.
- Mysore, K.S.;**Nam, J and Gelvin, S.B .(2000).An Arabidopsis histone H₂ A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA-integration.Proc.Natl.Acad. Sci., 97:748-953.



- Naher, M.;** Zinat, M.; Hasan, M.Z.; Khadiza, Z. and Fahmida, J. (2012). Effects of plasmid curing on *Rhizobium spp.* J. of Mic., 2: 2074-5346.
- Nesme, X.;** Leclere, M.C. and Bard, R. (1990). PCR detection of an original endosymbiont: the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. In National Dela Res. Agro., 47-50.
- Nester, E.W.;** Gordon, P. M; Amasino, R and Yanofsky, M. (1984). Crown gall: amdecular and physiological analysis .Ann. Rev. Plant Pathology, 35:387-413.
- Nikolic, R.;** Nevena, N.; Slavtca, N. and Mirjana, N. (2007) .Efficient genetic transformation of *Lotus corriculatus* L using a direct shot regeneration protocols, stepwise Hygromycin B-selection ,and A super-binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. Arch. Biol. Sci., 59 (4):311-3
- Ninkovic, S.;** Miljus, V. B. and Mirjana, N. (2004). Improved transformation of Alfalfa somatic embryos using a super binary vector. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 46:139-143.
- Odee, D.W.;** Haukka, K.; Mclursy, S.G.; Sprent, J.F.; Sutherland, J.M. and Young, J.P. W. (2002). Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. Soil Biology and Biochemistry, 34:801-811.
- Odutayo, O.I.;** Akinrimis, F.B.; Ogvnbosoye, I. and Oso, R.T. (2005). Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of Cowpea (*Vigna unguiculata*.) walp. African Journal of Biotechnology, 4:1214-1216.
- Ohtas, H. Y.;** Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) .Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L) Mediated by *Agrobacterium* and sequence- analysis of the boundaries of The T-DNA. J. Plant, 6: 271-282.
- Olsen, J. E.;** Brown, D. J.; Baggesen, D. L. and Bisgaard, M. (1992). Biochemical and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar berta, and of method for typing. Epidemiol. Infect., 108:243-260.
- Omwoy, O.;** John, V.; Mauoma, J. M. (2013). *Agrobacterium*-Mediated genetic transformation of selected tropic inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) Lines. Plant Cell Tissue Organ Cult., 113:11-23.



- Opabode, J.T.**(2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Bio Mol. Biol. Rev.*, 1:12-20.
- Ophel, K.** and Kerr, A.(1990). *Agrobacterium vitis*-new species for strains of *Agrobacterium biovor 3* from grapevine. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40:236-241.
- Padgett, S.R.;** Kolacz, K.H.; Delannay, D.B.; Lavallee, B.J.; Tinius, C.N.; Rhodes, W.K; otero, Y.I; Barry, G.F; Eicholtz, D.A; Peschke, V M; Nida, DL; Taylor, NB & Kishore, GM (1995) Development identification and characterization of aglyphosate-tolerant Soybean line. *Crop Science* 35:1451-1461.
- Paez-valencia, J. P. ;** Gomez, C. S.; Mayoral P. V.; Ramos A. C.; Lucas, I. H.; Segovia, A. O. and debuen, A. G. (2008). Localization of the MADS domain transcriptional factor NMH7 during seed, seedling and nodule development of *Medicago sativa*. *Plant science.*, 175: 596-603.
- Paffetti, D.;** Fabrice, D.; Silvia, F.; Stefano, G.; Franeesoa, L.; Carla ,S. and Marco, B.(1998). Influence of plant genotype on the selection of nodulating, *Sinrhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. *Antonie Van Leeuwen Hoek.*, 73:3-8.
- Palumbo, D. J. ;** Donald A.P. and Clavence I Kade .(1998). Characterization of A new *Agrobacterium tumefaciens* strain from Alfalfa (*Medicago sativa* L). *Arch Microbiol.* 169:381-386.
- Paolella, P.**(1998). Introduction to Molecular Biology. MC Grow Hill Companies.
- Park, D.** (1996). Conservation of PcaQ, a transcriptional activator of *Pea* genes for catabolism of phenolic compounds ,in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium species*. *J. Bacteriol.*, 178:3671-3675.
- Parkinson, J.S.**(1993). Singal transduction schemes of bacteria. *Cell*, 73:857-871
- Patnaik ,D.;** Dali ,V. and paramjit ,K.(2006) *Agrobacterium*-mediated transformation o mature embryos of triticum astivm and triticum durum. *Current Science*, VL.g1, No.3:307-317.
- Pellpck, B.J.;** Cheng, H.P. and Walker, G.C.(2000). Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.*, 182:4310-4318.
- Petit, A.;** Stougaard, J.; Kubles, A.; Marcher, K.A. and Tempe, J.(1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus*



corniculatus, a system of or molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. Mol.Gen.Genet.,207:245-250.

Petit,A.;David,F.; Dahle,J.G.; Ellis,P.;Guyon,F.;Casses,D. and Tepme,J.(1983). Further extension of the opine concept: plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation.Mol.Gen.Genetic, 190: 204-214.

Pierik,R.B.M. (1987). *In vitro* culture of Higher Plants.Kluwer Academic publishers. Boston.

Pierronnet, A. and Salesses, G. (1996). Behavior of prunus cultivars and hybrids towards *Agrobacterium tumefaciens* estimated from hardwood cutting. Agronomie, 16 :247-256

Piers, K.L.; Heath, J.D.; Liang, P.; stephens, K.M. and Nester, E.W. (1996).*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. Proceedings of the Nation . Academy of Sciences ,USA, 93:1613-1618).

Pinero, P.; Martinez, E .and Selander, R. K. (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* .Appl. Environ Microbiol.,54: 2825-2832.

Pionnat, S.; Keller, H.; Hericher, D.; Bettachini,A.; Dessaux ,Y.; Nesme, X.and Poncet, C. (1999).Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. Appl. Environ. Microbio.,1 65: 4197-4206

Porter,J.R.(1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Crit.Rev.Plant.Sci.,10:387-421.

Powell,G.K.;Hommes,N.G.;K,J.;Castle,L.A.and Morris,R.O.(1988).Inducible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics. Molecular Plant-Microbiobe Interactions ,1(6):235-242.

Prescotta,L.M.; Harley,J.P. and Kelin,D.A (2007). Microbiology Prokaryotes: Bacterial Genetic System Taxonomy Microbiology. bytes.22, No .5.

Price,G.D.;Mohapatra,S.S .and Gresshoff, D.M.(1984). Strucutre of nodules formed by *Rhizobium strain* ANU289 on the lthe non-legume *Parasponia* and the legume siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Bot.Gaz.,145:444-451

Procopio,R.E.L.; Araujo, W.L.W.;Maccherom, J.R. and Azewedo , J.L.(2009). Characterizoation of an endophytic bacterial



community associated with *Eucalyptus spp.* Genetics and Molecular Research, 8(4): 1408-1422.

Puchta, H. (1998). Repair of genomic double – strand breaks in somatic cells by one- side invasion of homologous sequences. Plant J., 13:331- 339.

Puddephat, J.; Riggs, T Jon Funning, TM (1996) Transformation of Brassica Oleracea L: a critical reviewing Mol.Breed 2:185-210.

Pueppke, S.G. and Broughton, W.J. (1999). *Rhizobium spp.* strain NGR234 and *R.fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Molecular Plant- Microbe Interactions, 12: 293-318.

Pulawska, J. and Sobiczewski, P. (2004) .Development of semi- nested PCR bases method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. J. of Applied Microbiology, 18:96-100.

Pupilli, F.; Labomb and Aricioni, S. (2001). New mitochondrial genome organization three interspecific somatic hybrids of *Medicago sativa* including the paren't-specific amplification of substoichiometric mitochondrial DNA Units. Springer-Verlay, 103:972-978.

Quandt, H. J.; Puhler, A.; Broev, K .(1993). Transgenic root nodule of *Vicia hirsulata*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate type nodules. Mol. B. Microb., 6: 699-706.

Rajbir , S.; Sang, w.; Yvan, B.; Spencer, B. and Gerard , V. (1992). Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*- mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. Planta. 188:439-456.

Razanskiene, A.; Grazinastaniene, R. D.; Gelvonauskiene, I.; Zalunskaitė, J. and Vidmantusstanys. (2006). Transformation of quince (*Cydonia oblonga*) with the *rolB* gene-based constructs under different promoters. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research , 14 (1) : 95-102.

Rasool, S. A.; Ahmad, A.; Khan, S. and Wahab, A. (2003). Plasmid borne antibiotic resistance factors among indigenous *Klebsiella pneumonia* .J.Bot., 35(2) 243-248.

Raveendar, S. and Ignaciruthu, S. (2010). Improved *Agrobacterium* mediated transformation in *Compvigna unguicalata* L.walp. Asian Journal of Plant Sciences , 9:256-263.



- Rawsthorne, S.;** Minchin, R. J.; Sumerfifd, C.; Cooks, N.(1980). Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules, *Phytochemistry* 341-355.
- Rekha Singh,N.P.;** Subbujit, D,Indusingh ,Y. and Singh, A.P. (2009). *Agrobacterium* mediated transformation of Chickpea using shoot meristem. *India Journal of Biotechnology*, 8:78-84.
- Rhouma, A. A.;** Boubaker, X.; Nesme .and Dessaux,S. (2006). Plasmid and chromosomal diversity of Tunisian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Tunisian J.Plant*, 1:73-84.
- Ridge, R. W.** and Rolfe, B. G. (1985). *Rhizobium spp.* Degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 717-720.
- Riva, G.A.;** Conzalez-Cabrera, J.; Vasqu-padruj.and Ayra-pardo ,C. (1998). Gene transfer to plant cell. *Electronic J. Biotechnol .*, 2: 3.
- Rivas,R.;**Willems,A.;Subba Rao, N. S.; Mateos, P.F.; Dazzo. F. B.; Kroppenstedt, R. M.; Martinez., M. E.;Gillis,N.and Relasquez, E.(2003). Deseirtion of *Devosia neptaniae sp. nov.*that nodulats and fixes nitrogen in symbiosis wit *Neptunia natansoon* aquatic legume from India. *Systematic Applied Microbiogy*, 26:47-53.
- Roberts, G.** (2003). Transformation. (ed.,T., Paustain, University of Wisconsin Madison.
- Roger, H.;** PhilifMulliaeux and Harry Klee (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti Vectors trends in plant science. V5: N10:446-451.
- Rolfe, B.G.** and Gresshoff, P.M. (1988). Genetic-analysis of legume nodule Initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 297-319.
- Ronald, M.** (2006). Hand Book of Microbiological Media for the Examination of Food.Informa Taylor & Francis Group. Second Edition,Bocaraton London NewYork.
- Rose,R.J.** and Nolan .(1995) .Regeneration of *Medicago truncatula* from protoplast isolated from protoplasts isolated from kanamycin-resistant plants. *Plant Cell Rep.*,14:349-353
- Rosenbery, C.;** Casse-Delbart,F; Dela Judie,P.; Jouanin,L.; Batut; J.; Bolstard, P.; Julliot,S.J and Denarle .(1983). Studies on *Rhizobium meliloti* Plasmids and on Their Role in The Control of Nodule Formation and Nitrogen Fixation: The pSym Megaplasmids .Springer Verlag Berlin Heidelberg.



- Sagan, M.;** Mormdi, D.; Tarengi, E. and Due, G. (1995). selection of nodulation and mycorrhizal Mutants in the model plant medicago truncatua (Gaerth). After gamma- ray mutagenesis. Plant Sci;111;63-71.
- Sahi, S.V.**(1990) Corn metalites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens* . Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 87:3879-3883.
- Sahoo, L.;** Sushma, S.; Singh, N.D and Jajwal, P.K.(2000) *In vitro* plant regeneration and recovery of cowpea (*Vigna unguiculata*) transformation via *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Biotech. and Mol. Biol.,1:47-54.
- Salle, A. J.** (1973). Fundamental Principles of Bacteriology .7thed., McGraw-Hill Book Company, New York, U.S.A.
- Saini, R.;** Jawal, P. K.(2007). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of blackgram an assessment of factors influencing the efficiency of uidgene transfer. Biologia Plantarum, 51 (1): 69-74.
- Samac, D.A.;** Mesfin ,T.; Melinda, D.; Purev, S. and Stephen J.T.(2004) A comparison of constitutive promoters for expression of transgenic in alfalfa. Transgenic Research.13:349-361.
- Sambrook, J.;** Fritsch, T.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory. New York, USA.
- Sanyal, L.;** Singh, A.K and Amla, D.V.(2002). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of Chickpea (*Cicer arietinum* L) using mature embryogenic axes and cotyledonary nodes. Ind. J. Biot., 2(4): 533-538.
- Sarka, M.A.;** Ravillion, B.; Noel, G.R .and Farmands, S.K.(1990). Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use of propagate the soybean. Cyst nematode, 80:503-508.
- Sarker, A.Q.;** Palash ,C.; Mondol, S. I. and Mohammad, F. A. (2011). Identification of virulent *Agrobacterium tumefaciens* strains from some dicotyledonous plants in Bangladesh. Agriculture Conspectus sciencificus, 176(2): 147-152.
- Saunders ,J.W.** and Bingham, E .T.(1972). Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop Sci .,12:804-808.
- Saunders, J.W.** and Bingham, E.T.(1975). Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. Amer. J. Bot.,62(8):850-855.



- Schacterle, G.R.**, and Pollack, R.L., (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.* 51:654-655.
- Schell, J.** (1979). Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens* the Ti plasmide and the plant host. *Proc. R. Soc., London Ser .*, 204: 251-266.
- Schiene, K.**; Donatn, S. and Uhler, A. (2004). A fab-related small GTP binding protein is predominantly expressed in root nodules of *Medicago sativa*. *Mol. Gen. Genomics*, 272:57-66.
- Schlaman, H.R.**; Olsthoorn, M.M.; Hartevald, M.; Dovner, L.; Djordjence, M. A.; Thomasoates, J.E. and Spaink, H.P. (2006) .The production of species-specific highly unsaturated fatty acycontainirey Lcos from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is strain gently reglulated by nod D and involves the Nod RL Genes .*Molecular Plant Mic. Interaction* ,19:215-226.
- Scholte, M.**; EVfurth, I. and Ripa, S. (2002). T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Mol. Breeding*, 10:203-215.
- Schwedock, J. S.**; and Long S. R. (1992). *Rhizobium meliloti* genes involved in sulfate activation: The two copies of Nod PQ and a new locus. *J. Gene.*, 132: 899-909.
- Schwedock, J.S.** and Long, S.R. (1990) .Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *Rhizobium meliloti* nod P and nod Q. *Molecular Plant Microbe Interactions* ,2:181-194.
- Seitzkris, N. E.** and Bingham, E.T. (1988). Interaction of highly regeneration genotypes of alfalfa (*Medicago sativa*) and tissue culture protocols. *Invitro Cellular and Development Biology*, 24 (10):1047-1052.
- Senaratha, T.**; Mckersie, B. and Bowley, S. (1989). Desiccation tolerance of Alfalfa (*Medicago sativa* L) somatic embryos. Influence of abscisic acid stress pre-treatment and drying rates. *Plant Sci.*, 65:235-259.
- Shah ,S. H.**; Wainwright, S.J. and Merrett, M.J. (2003). Regeneration and soma clonal variation in *Medicago sativa* and *Medicago media*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(9): 816-820.
- Shaw, C.H.** (1991) Swimming against the tide: chemotaxis in *Agrobacterium*. *Bioessays* ,13:25-29



- Shishido, M.** and Pepper, I.L. (1990). Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Bio. Bioch.*, 22: 11-16.
- Skinner, F. A.;** Roughley, R.J. and Chandler, M.R. (1977). Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion in *Rhizobium spp.* *J. Appl. Bacteriol.*, 43: 287-297.
- Skotnicki, M.L.** and Rolfe, B.,G. (1978). Transfer of Nitrogen fixation genes From a Bacterium with the characteristics of Both *Rhizobium* and *Agrobacterium* *J of Bacteriol.*, 133(2): 518-526.
- Smith, E. F.** and Townsend, C.O. (1907) .A Plant-Tumor of Bacterial Origin. *Science*, New York, 25: 671- 673
- Snusted, D.P.** and Simmons, M. J.(2000). *Principles of Genetics*. 2ed., John Wiley and Son., Inc. Ny. U.S.A.
- Soltis, P.S.;** Soltis, D. E.; Savolainen, V.; Crane, P.R. and Barraclough, T.G. (2002) .Rate heterogeneity among lineages of tracheophytes: integration of molecular and fossil data and evidence for molecular living fossils. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 4430-4435.
- Somers, D.;** Samac, A. and Molhoft, P. (2003). Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol.*, 131:892-899.
- Song, G.** and Walworth, A. (2012). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of Switchgrass cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 108:445-453.
- Sonia, S.;** Singh, R. P. and Jaiwal, P.K.(2007). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* amylase inhibitor- 1 gene into mungbean (*Vigna radiate* L. Wikzek) using bar as selectable marker .*Plant. Cell Rep.*, 26:187-198.
- Soriful, I.;** Munsina, A.; Atikur, R.; Mostafizu, R.; Manuluda, A. and Firozen. (2010) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall sample of dicot plants in Bangladesh. *Current Research in Bacteriology*, 3(1):27-36.
- Southern; E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*, 98:503-517.
- Spaink, H.P.** (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 257-288.
- Spaink, H.P.;** Sheeley, D.M.; Van, B.,N.; Glushka, York, W. S.; Tak, T.; Geiger, O.; Kennedy., E.; Reinhold, V. N. and Lugtenberg, B.J.J.



- (1991). Anovel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*,354: 125-130.
- Spaink, H. P.;** Wjiffelman, C. A.; Peese,E.; Okker R.J.H.; Lugtenberg, B. J. J.(1987). *Rhizobium* nodulation gene n, d D as a determinant of host specificity. *Nature* ,328,337-339.
- Sprent,J.I.** (2001). *Nodulation in Legumes*, Royal Botanic Gardens,Kew.
- Sprent,J.I.** (2008).Evoltion and diversity of legume symbiosis in Dilwrth, M. J., James E.K., Sprent J. I., Ne wtong W.E.(eds.) *Nitrogen fixing leguminous*.Netherlands,pp.1-18.
- Staniene, G. I.;** Rugienius, R.; Gelvonauskiene, D. and Stanys,V. (2007). Effect of *rolB* transgene on *Prunus cerasus*×*P.canescens* and *Cydonia oblonga* microshoot rhizogenesis.*Biologija*,18(1) :23-26.
- Stewart ,C.N.,**Adang,M .J.; AllJn,B.; Cardineau, H.R.; Tucker,D. and parrott,W.A. (1996). Genetic transformation recovery and characterization of fertile soybeach transgenic for synthetic *Bacillus thuringiensis* cry IAC gene.*Plant Physiol.*,112:121-129.
- Stiller,J.L.;**Martirani,R.;Tuppalech,M.;Chiurazzi and Gresshoff,P.(1997) High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume Lotus Japonicas.*J.Exp. Botony*,48:1357-1365.
- Strohmaier,H.;**Noiges,R.;Kotschan,S.;Sawers,G.; Hogenauerg G.; Zechner, E. L.; Koraimann, G.; Zechner, E. L.; Koraimann, G. (1998). Single transduction and bacterial conjugation characterziation of the role of Arc A in regulating conjugation transfer of the resistance plasmid Ri. *J.Mol.Biol.*,277:309-316.
- Strteit,W.R.;**Schmitz,R.A.;Perrot,X.;Stachelin,C.;Deakin,W.;Raasch,C.; Liesegang,H. and Broughton,W.J.(2004).An evolution any hot spot:The PNGR234b repicon of *Rhizobium spp* strain NGR 234.*J. Bacteriol.*,186:535-542.
- Subba- Rao, N.S.**(1981). Response of crops on *Azospirillum* inoculation in India In: *Associative N2 fixation* , Crose D.B. and Ruserche A.D. (eds.) , CRC Press, USA., PP:137-144.
- Sulieaman ,S.** and Schulze, J .(2010) .The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*.*Journal of Physiology*, 167:683-692.



- Sullivan, M. L.;** Hatfield, R. D.; Thoma,S.L. and Samac,D.A.(2004). Cloning and Characterization of red clover polyphenol oxidase CDNAS and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa.Plant Physiol.,136:3234-3244.
- Sutton,W. D.;** Pankhurst,C. E. and Crai, A. S.(1981). The Biology of Rhizobiaceae. ed by Giles KL,Atherly,AG.NewYork. Academic: 149-177.
- Swamynathan, S. K.**and Singh,A.;Pleiotor, P. (1995). Effects of purine auxotrophy in *Rhizobium meliloti* on cell surface molecules. J. Biosci., 20:17-28.
- Szegedi ,E.;** Czako, M.; Otten, L.; Koncz, C. (1988). Opines in crown gall tumors induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. Physiol. Mol. Plant Pathol.,32:237-24
- Talaro, K.** and Talaro, A.(1996). Foundation in microbiology. 2nd ed., W.M.C. Brown Publishers,PP :281-282 .
- Tarbah, F. A.** and Goodman, R.N. (1986). Rapid of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagation material and the basis for an efficient indexing system Plant disease. plant Biotechnology, 70:559-566.
- Tazeen, S.** and Mirza, B. (2004). Factors of affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated Genetic transformation of *Vigna radiate* (L) Wilczek Pak.J.Bot.,36(4): 887-896.
- Temple, S.J.;**Vance, C.P. and Ganett, J.S.(1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation.Trends in Plant Science, 3:51-56.
- Thies,J.E.;**H,Imes,E.M. and Rachot,A.(2001). Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review. Australian J. of Experimental Agriculture, 41:229-319.
- Thipmani,P.**(1984). Pathway of Pollen and rogenesis in field bean. Inter. Sym. on the Gen. Manip. of Crop.,2:212-219.
- Thomas,M.R.;**Rose, R. J.and Nolane, K.E. (1992). Genetic transformation of *Medicago trncatula* using *Agrobactrum* bacterium with genetically modified Ri and Ti Plasmids.Plant Cell Rep.,11:113-117.
- Thu, I.I.;** Mai ,T,T.;Deude, E.;Farsis,T.; Anyenum, G.;Jacobs M.(2003). *Invitro* regeneration and transformation of Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.Mills P) .Mo.Breed.,11:159-168.



- Tomoeda, M.;** Inuzuka, M.; Anto, S. and Konishi, M. (1974). Curing action of sodium dodecyle sulfate on a *Proteus mirabilis* R⁺ strain. J. Bacteriol., 120: 1158-1163.
- Torisky ,R.S.;** Kovacs, L.; Avdiushko, S.; Newman, J.D.; Hunt A.G. and Collins, G.B. (1997). Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. Plant Cell Rep., 17:102-108
- Trinick,M.J.**(1973). Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume,Tremasfera.Natureg,244:459-460.
- Trujillo, M. E.;** Willems, A.; Abril, A.; Planchuelo, A. M.; Rivas, R.; Ludena, D.; Mateos., P. F.;Martinez-Molina, E. and Velazqu, Z. (2005). Nodulation of *Lapinus albus* by strains of *Ochrobacterum luini* sp. Nov.Applied and Environmental Microbiology, 71:1218-1327.
- Tzfira, T.** and Citovsky, V.(2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Science d direct, Current Opinion in Biotechnology , 17:147–154
- Tzfira,T.**and Citovsky,V.(2002). Partners in infection:host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium* trends. Cell Biol.,12:121-128.
- Udvardi, M. k.**and Day, D.A.(1997). Metabolite transport across symbiotic membrances of legume nodules. Ann. Rev. Plant Physiol.,48:493-523.
- Ulrike ,A.;** Ruth ,B.; Otto ,H., Alfred ,P. and Karsten, N. (2001). Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. New Phytologist.,151: 597-606.
- Valerie, O.** and Sharon, R. L. (1999) .Bacterial genes induced the nodule during the *Rhizobium* legume symbiosis. Molecular Microbiology, 32(4):837-849.
- Valverde, A.;**Verlazqeze,S.; Vizcaine, N.; Rivas ,R.; Mateos, R.F.; Molina, E. M. and Lgnal, J. A.(2005).*Phyllobacterium trifolii* sp.,nodulating Trifolium and lupines in Spanish soils.Int. J.Syst. Evol. Microbiol., 55: 1985-1989.
- Vander, D. K.;** Spaink, H.P.; Bloemberg.; G.V.;Van brussel; A. A.; Lugtenberg, B.J.J.; Haverkamp, J. and Thomase-oates, J. E. (1996). *Rhizobium Leguminosarum* bv. *trifolii* produces lipochitin oligo- saccarides with fatty acyle moieties. J. Biol.Chem., 37:22563-22569.



- Vanrhijn, P.V.** and Vanderleyden, J.(1993). Multiple copies of nod D In *Rhizobium tropici* CIAT 899 and BR816. *J. Bacteriol.*,175:438-447.
- Vasse, J.F.;** Billy,S.;Camut ,D.and Truchet,C. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules.*J.Bacteriol.*,172:4295-4306.
- Vergunst,A.C.**(2000) .Vir B I D₄- dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, 290:979-982.
- Vincent,J.M.**(1970). A manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria.IBP Handbook No.15. Oxford: Blackwell Scientific Publication,Oxford,PP.113-131.
- Vincent,J.M.**(1974). Root-Nodule symbiosis with *Rhizobium* in:the Biology of Nitrogen Fixation (eds.),A.Q uispel.North-Holland,Publishing,Company,Amsterdam.PP 265-341.
- Walker,K.A.**and Sato, S. J. (1981). Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1: 109-121.
- Webster,G.;**Puulton,P.R.; Cocking,E.C.and Davay,M.R.(1995). The nodulation of micro-propagated plants of *Parasponia andersonii* by tropical legume rhizobia. *J.Exp.Bot.*,46:1131-1137.
- Weir,B.S.**(2006)The current taxonomy of rhizobia.Newzealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.conzltaxonomy/rhizobiahtml>.
- Weising, K.** and Kahl, G. (1996). Natural genetic engineering of plant cell: the molecular biology of crown gall and hairy root disease world .*J. Micro. Technol.* ,12: 327-351.
- Weller, S. A.;** Stend,D.E. and Mazzucchi,V. (2004). Crown and cane gall of a backberry raspberry hybrid caused by *Agrobacterium rhizogenes* in northern Italy.*Journal of Plant Pathology.*,86(2):161-165.
- Welsh, J.** and Mclelland,M.(1991). Genomic finger prints produced by PCR with consensus tRNA gene Primers.*Nucleic Acids Res.*, 19:1861-1866.
- Wessells,N.K.** and Hopson,J.(1988). *Biology* Rnadam House,INC.,New York.PP.303-320.
- Whittam,T.S.**(1992). Sex In Soil.*Current Biology*, 2:676-678.
- Willetts, N.** and Wilkins, B. (1984) .Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation.*Microbiologica Reviews*,48(1):24-41.



- Williams, H.G.;** Day, M. J.; Fry, J. C .and Stewart, G. J.(1996). Natural transformation in *River epilithon*. Appl.Environ. Microiobl., 62:2994-2998.
- Williams, S. T.;** Goodfellow, M.; Wellington, E. M. H.; Vickers, J. C.; Alderson, G. Sneath, P. H. A.; Sackin, M. J. and Mortimer, A. M. (1983). A Probability matrix for identification of some streptomycetes J. Gen. Microbiol., 129: 1815-1830.
- Wilson, K.** and Walker, J.(2004). Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge University Press.
- Winans, S.C.**(1992). Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions .Microbiology Reviews, 56:12-31.
- Wojtaszek ,P.;** Stobiecki, M. and Gulewicz, K.(1993). Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of intact white lupin (*Lupinus albus* L) plants. J.Plant Physiol., 142:689-694.
- Wong, C.H.;** Pankhurst, C. E.; Kondorosi, A. and N. D Broughton, W. J. (1983). Morphology of root nodules and Nodule- like structures formed by *Rhizobium* and *Agrobacterium* strains containing *Rhizobium meliloti* megaplasmid . J of Cell Biology, 97 :787-794.
- Wood, P.J.**(1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. Carbohydr. Res., 85:271-287.
- Wood, S.** and Newcomb ,M. W.(1989). Nodule morphogenesis the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. Can.J.Bot., 67:3108-3122.
- Wu, D.Y.;** Vgozzoli, L.; Pal, B.K.; Qian, J. and Wallace, R.B.(1991). The effects of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by polymerase chain reaction DNA .Cell Biol., 10:233-238.
- Wu, H.;** Sparks, C.; Amoah, B. and Jones, H.D.(2003). Factors influencing successful *Agrobacterium*. mediated genetic transformation of wheat .Plant Cell Rep., 21:659-668.
- Xi- Wan;** Jan, H.; Alessandra ,L.; Chiara ,G.; Diederikvande ,P.; Elena, F.; Ton, B. and Henk, F. (2007) *Medicago truncatula* EWoD40-1 and ENOD 40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development .J. of Experimental Botany., 72: 1-9.
- Xie, Z.;** Stacheline, C.; Viereiling, H.; Wiemken, A.; Jabbowri, S.; Broughton, W. J.; Vogeli-Lange, R. and Boller, T.(1995). Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization



- of nodulation and non-nodulating soybeans. *P. physiology*, 108:1519-1525.
- Xu, N.** and Bewley, J.D. (1991). Sensitivity abscisic acid and a smoticum changes during embryo-genesis of alfalfa (*Medicago sativa* L). *J. Exp. Bot.*, 42:821-826.
- Yadav, N.S.;** Vanderleyden ,J.; Bennett ,D.R.; Barnes ,W.M. and Chilton, M.D. (1982). Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 6322-6326.
- Yan, B. M.;** Reddy, G.B. Collins, D. and Dinkin, S, R. (2000). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybean *Glycine max* (L) Merrill using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Rep.*, 19:1090-1097.
- Yassin, A.;** Fredrick, K. and Mankin, A. S. (2005). Deleterious mutation in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102: 16620-16625.
- Young, J.M.;** Kuyken, L.D.; Martinez ,R. E.; Kerr A.; Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* 1889 with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* and *Allorhizobium undicola*. As new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology* ,51: 89-103.
- Yusibov, V.M.;** Steek, T.R.; Gupta, S and Gelvin, B. (1994). Association of the single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc. Nati. Acad. Sci., USA.*, 91: 2994-2998.
- Zaenen, I.;** Van, L. N.; Van, M. M. and Schell ,J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology*, 86: 109-127
- Zagorksa , N.;** Dimitrova, B. and Polin, G. P. R. (1997). Regeneration and characterization of plants obtained from anther cultures in *Medicago sativa*. L. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 33:107-110.
- Zambryski ,P.;** Depicker ,A.; Kruger, K.; Goodman ,H.M. (1982). Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 361-370
- Zambryski, P.** (1988) Basic process underlying *Agrobacterium* mediated DNA transfer to plants cells. *Annu. Rev. Genet.*, 22:1-30.



- Zhang,Z.;**Aliqinxing,P.; Staswick and Thomas,E.E. (1999). The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium* mediated transformation of Soybean.Plant Cell,Tissue and Organ Culture, 56: 37-46.
- Zia, M.;** Zarrin, R.; Riaz, V.; Rehman, H. and Fayyaz,M.(2010). *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.) som condtions standardization. Pak.J.Bot.,42(4):2269-2279.
- Zohary, M.** and Heller, D. (1984). The genus *Trifolium* .The Academy of Sciences and Humanities.Ahva rinting press,Jerusalem.Israel.
- Zupan, J. R.** and Zambryski, P.C. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiology, 107:1041-1047.
- Zupan, J. R.** Citovsky,V. and Zambryski, P.C.(1996). *Agrobacterium* VirE2 Protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA., 93:2392-239.

الملاحق

Appendices

الملحق (1) وسط Carbohydrat Fermentation (Atlase, 2010)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
Pepton	10
NaCl	5
Phenol Red	0.018
السكر المراد إختباره	20 ml (1% Stock)

الملحق (2) وسط Tryptone Yeast Extract (Khenuja & Kumar, 1988)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
Trypton	5.00
Yeast Extract	3.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.12
PH (7.0)	

الملحق (3) وسط Nutrient glucose Agar (Moore et al., 1988)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
Beef Extract	3
Peptone	20
Glucose	2.5
15 Agar	

الملحق (4) وسط PDA-CaCO₃ (Moore et al., 1988)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
PDA	20
CaCO ₃	0.8
7.5 Agar	

الملحق (5) وسط Motility Test (Moore et al., 1988)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
Nutrient broth	10
K ₂ HPO ₄	1.1
KH ₂ PO ₄	0.49
3.0 Agar	
PH (7.0)	

الملحق (6) مكونات وسط YEB (Lichtenstein & Draper, 1986).

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
Beef Extract	5.0
Yeast Extract	1.0
Pepton	5.0
Sucrose	5.0
MgSO ₄	2 M
15.0 Agar	
pH (7.0)	

الملحق (7) وسط Lactose Agar (Moore et al., 1988)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
α-Lactose	10
Yeast Extract	1.0
20 Agar	

الملحق (8) مكونات وسط AM (Muragesan et al., 2010).

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
Typtone	5.0
Mannitol	5.0
Yeast Extract	2.5
L-glutamic acid	1.0
KH ₂ PO ₄	25
NaCl	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1
Biotin	10 ml (0.1 mg/ml Stock)
15.0 Agar	
pH (7.0)	

الملاحق (9) مكونات وسط MS (Murashige & Skoog, 1962).

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
NH ₄ NO ₄	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
K ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
H ₃ BO ₃	0.200
KI	0.830
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0250
MnSO ₄ .2H ₂ O	22.300
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.850
Na ₂ EDTA	37.250
Glycine	2.0
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine- HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
سكروز 30 غرام	
غرام 8 آكار	
pH 5.8-6.0	

الملحق (10) مكونات وسط WP (Lloyd & McCown, 1980).

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
NH ₄ NO ₃	400
CaCl ₂	72.5
K ₂ SO ₄	999
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	180.7
H ₃ BO ₃	6.2
Ca(NO ₃) ₂	386
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
MnSO ₄	22.3
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.9
Na ₂ EDTA	37.3
30.000 Sucrose	
5000 Agar	
PH (5.8-6.0)	

الملحق (11) مكونات وسط B5 (Gamborg et. al., 1968)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
KNO ₃	2500
CaCl ₂	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150
KI	0.75
H ₃ BO ₃	3.00
MnSO ₄ .4H ₂ O	10.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.800
Na ₂ -EDTA	37.300
Myo-Inositol	100
Nicotinic acid	1.00
Pyridoxine-HCl	1.00
Thiamine-HCl	10.0
Sucrose	20000
Agar	8000
pH	5.5

الملحق (12) مكونات وسط NF (Fahraeus, 1957)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
CaCl ₂ .2H ₂ O	132
KH ₂ PO ₄	100
Na ₂ HPO ₄	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	120
Fe Citrate	0.05
H ₃ PO ₃	0.062
MnSO ₄ .2H ₂ O	0.11
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.28
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.024
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.024
8.000 Agar	
PH (6.5)	

الملحق (13) مكونات وسط YEM (Vincent, 1970).

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	10
Yeast extract	0.4
15.000 Agar	
PH (7.0)	

الملحق (14) مكونات وسط King's B (Ronald, 2006).

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
Proteose Peptone No.3	20
K ₂ HPO ₄	1.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5
Glycerol	10.0 ml
15.0 Agar	
PH (7.2±0.2)	

الملحق (15) مكوّنات وسط GPA Glucose Peptone Agar (Ronald, 2006).

المكوّنات	التركيز (غرام/لتر)
Peptone	20
Glucose	10.0
NaCl	5.0
15.0 Agar	
PH (7.2±0.2) at 25°C	

الملحق (16) مكوّنات وسط LB Luria Bertani Agar (Miller,1987).

المكوّنات	التركيز (غرام/لتر)
Tryptone	10.0
NaCl	10.0
Yeast Extract	5.0
15.0 Agar	
PH (7.5±0.2) at 25°C	

الملحق (17) مكوّنات كاشف نترات الفضة القاعدي
Alkaline Silver Nitrate Reagent (AgNO₃)

المكوّنات	الكمية
محلول A	
AgNO ₃	0.25 غم
أسيتون	20.0 مل
تذوب المكوّنات جيّداً ويكمل الحجم النهائي الى 100 مل بإضافة ماء مقطر	
محلول B	
20 % NaOH	5.0 مل
ميثانول	45.0 مل

الملاحق (18) مكونات وسط استهلاك المصادر الكربونية Carbon utilization medium
(Williams et al., 1983)

المكونات	التركيز (غرام/لتر)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64
KH ₂ PO ₄	2.38
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	5.65
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0

15.0 Agar

PH (7.0±0.2) at 25°C

الملاحق (19) التحاليل الرقمية لنواتج تضخيم الـ DNA البلازميدي لعينات بكتريا *tumefaciens* البرية والمهندسة وراثياً (للجين *rol-B*) باستخدام تقنية الـ PCR الشكل (22)، الجدول (38) وفق برنامج CS analyzer.

2514				
Sample Name	Peak No.	Intensity	Percent	Molecular Weight
	Lane No.1			
	1	36224	12.489	2557
	2	14976	5.163	2000
	3	11648	4.016	1500
	4	28352	9.775	1000
	5	13376	4.612	900
	6	15168	5.229	809
	7	17152	5.914	700
	8	16000	5.516	600
	9	37760	13.019	500
	10	21504	7.414	395
	11	26688	9.201	300
	12	26560	9.157	203
	13	24640	8.495	85
	Total	290048	100.000	11549
	Lane No.2			
	1	12480	100.000	900
	Total	12480	100.000	900
	Lane No.3			
	1	25344	100.000	900
	Total	25344	100.000	900

A. الملحق (20) التحاليل الرقمية لنواتج تضخيم الـ DNA البلازميدي لعينات بكتريا *tumefaciens* البرية والمهندسة وراثياً والناتجة من الاقتران (للجين *rol-B*) باستخدام تقنية الـ PCR الشكل (23)، الجدول (38) وفق برنامج CS analyzer.

Top				
Sample Name	Peak No.	Intensity	Percent	Molecular Weight
	Lane No.1			
	1	125330	23.854	2500
	2	4243	8.244	1385
	3	31106	5.795	1500
	4	93922	17.501	1000
	5	26878	5.003	300
	6	25670	4.783	300
	7	22346	4.164	704
	8	3473	0.647	500
	9	70517	13.140	496
	10	15704	2.925	400
	11	28237	5.262	294
	12	24005	4.474	202
	13	25217	4.693	110
	Total	536654	100.000	11509
	Lane No.2			
	Total	C		
	Lane No.3			
	1	34277	100.000	300
	Total	34277	100.000	300
	Lane No.4			
	1	18120	100.000	300
	Total	18120	100.000	300
	Lane No.5			
	1	8905	100.000	300
	Total	8905	100.000	300
	Lane No.6			
	1	25217	100.000	300
	Total	25217	100.000	300

الملحق (21) التحاليل الرقمية لنواتج تضخيم الحمض النووي المستخلصة من أنسجة نباتات الجت المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens* البرية (للجين *rol-B*) باستخدام تقنية الـ PCR الشكل (29)، الجدول (50) وفق برنامج CS analyzer.

Sample Name	Peak No	Intensity	Percent	Molecular Weight
	Lane No.1			
	1	57456	11.782	2500
	2	25736	5.207	2000
	3	34440	7.062	1534
	4	47112	9.611	1100
	5	23302	4.697	919
	6	21000	4.306	800
	7	28516	5.868	700
	8	24360	4.935	612
	9	41100	8.422	500
	10	32122	6.618	417
	11	39760	8.158	308
	12	52138	10.691	200
	13	50064	10.266	
	Total	487740	100.000	11471
	Lane No.2			
	1	9120	100.000	900
	Total	9120	100.000	900
	Lane No.3			
	1	8000	100.000	900
	Total	8000	100.000	900
	Lane No.4			
	1	8580	100.000	900
	Total	8580	100.000	900
	Lane No.5			
	1	9460	100.000	900
	Total	9460	100.000	900
	Lane No.6			
	Total	0		
	Lane No.7			
	Total	0		
	Lane No.8			
	Total	0		

الملحق (22) التحاليل الرقمية لنواتج تضخيم الحمض النووي المستخلصة من أنسجة نباتات الجت المحولة وراثياً ببكتريا *A. tumefaciens* المهندسة وراثياً (للجين *rol-B*) باستخدام تقنية الـ PCR الشكل (30)، الجدول (51) وفق برنامج CS analyzer.

Peak No.	Intensity	Percent	Molecular Weight
Lane No.1			
1	106650	17.548	2500
2	34650	5.701	2000
3	25380	4.176	1520
4	95130	15.652	1000
5	28350	4.665	900
6	35910	5.908	800
7	44370	7.300	700
8	26370	4.339	600
9	106290	17.489	500
10	33210	5.464	405
11	37620	6.190	300
12	26550	4.368	203
13	7290	1.199	100
Total	607770	100.000	11528
Lane No.2			
Total	0		
Lane No.3			
Total	0		
Lane No.4			
Total	0		
Lane No.5			
1	34020	100.000	900
Total	34020	100.000	900
Lane No.6			
1	24210	100.000	900
Total	24210	100.000	900
Lane No.7			
1	32760	100.000	900
Total	32760	100.000	900
Lane No.8			
1	21960	100.000	900
Total	21960	100.000	900

Summary

The Present Study initially aimed in isolation of two genera of bacteria belonging to Rhizobiaceae *A. tumefaciens* were isolated from crown galls formed on stems of *Myrtus Communis* present in gardens of Education College and given symbols (AtMcol) according to respective host plant and the bacterium (*Sinorhizobium meliloti*) isolated from root nodeles formed on four varieties of *M. sativa* and given symbols (Rh1,Rh2,Rh3 and Rh4).

The bacteria was identified depending on morphological and cultural features, biochemical and biological tests both pathogenic and symbiotic . The results of molecular identification were enhanced by electrophoresis on agarose gell of plasmid nuclear acid isolated from wild strain *A. tumefaciens* (AtMcol) and standard strain *A. tumefaciens* (C58C1) as a compared class. After amplification with specific polymerase chain reaction sPCR using special primers, it was observed separation of one band belonging to the gene *rol B* with molecular weight 900 bp for both wild and genetically engineered strains.

On the other hand isolate Rh1 was selected for the latter genetical experiments. It was determined on its possession or losing resistance character the 12 antibiotics as genetical criterion . This criterion was confirmed to be cured by acrydine orange and using the bacterium as a recipient and donor in conjugation to confirm the horizontal transport of genes between the two genera. The results of successful conjugation were confirmed by observing the formation of root nodule and crown gall on Alfalfa seedlings by transconjugant *Agrobacterium* and transconjugant *Sinorhizobium* resulted from conjugation successively . In addition the characterization plasmids DNA content with confirmed transport of nuclear DNA plasmid from the donor to the recipient cells and increase of its concentration in conjugant cells. The results in this concept confirm that wild isolate *A. tumefaciens* (AtMcol) in having one plasmid while the standard isolate had two plasmids during electrophoresis on agarose gell. During amplification DNA of plasmids of transconjcant *Sinorhizobium* (1, 2) exhibited separation of single band of *rol B* gene on agarose gel, also the molecular weight of these separated bands identical with molecular weight of 900 bas pair for *rol B*.

In tissue culture experiments MS media supplemented with growth regulators such as Kin (0.1 mg\l) +2,4-D(1.0 mg \l) were distinguished in promoting callus formation from leaves and roots at ratio 90 and 100% successively On the other hand the medium Kin (2.0mg\L) +2,4-D (2.0mg\L) formed callus from hypocotyl stem of seedlings in addition to formation of regeneration branches at number reached to 24 and of ratio 20% in one period using well quality systems for transformation of path of genetic transport in

Alfalfa plant using *A. tumefaciens* As natural vector from the prominent results in this part The finding of effecient protocol for the production of vegetative branches genetically transformed by direct injection and using different densities of bacterial inoculum . This was presented by induction of crown galls on stem pieces under cotyledons through 12 days from injection and on injection seedling in which the crown galls by quick formation extension of their appearance to another position not injected and surpassed the cotyledons galls through 13 days since infection. The tumors pieces taken with part of the stem were distinguished by their ability to grow and developed to typical cultures of callus transformed genetically from crown galls on 1\2 MS medium at ratio reached 62.2%. The most important test proved the success of genetic transformation of callus derived from crown galls its ability to grow and reproduction on selective media containing Rifampicin and Gentamycin at concentration of 100 & 40 mg\L respectively. In addition to the ability of vegetative branches derived from crown galls their growing of MSO medium supplemented with the two above antibiotics and their duration to grow and give additional branches for more than four weeks.

The results in enhanced the probability of transformed the carried genes of T-DNA of Ti plasmid from the bacteria to plant tissue to prove this at molecular level genomic nuclear acid was isolated from tissues of crown galls callus and vegetative branches differentiated from them and the amplification of nuclear acid isolated by PCR using special primer of *rol B* gene which was connected to gene resistant to Rifampicin carried on T-DNA and their entrance in the genom of Alfalfa cells.

The data of electrophoreses of extracted and amplified DNA from transformed tissues exhibited the separation of single band *rol B* gene in agarose gel, also molecular weight of this separated bands were identical with molecular weight of 900 base pair for *rol B* gene with absence of separation of similar bands from the amplified DNA of hypocotyl, derived calls and differentiated shoots (control sample). The difference of morphological variation and also genetic variation made clear explanation of successful of transformed T-DNA and gene expression of itself on these transformed tissues. The results of testing nopaline & octopine in the tissues of crown galls formed by the action of wild & genetically engineered bacterium *A. tumefaciens* and its callus gave positive result by separation of opines spots at positions similar to the standard opines. This results made clear and individual the type of plasmids which carried on wild strain *A. tumefaciens* (AtMcol) was octopine type and standard strain *A. tumefaciens* (C58C1) was nopaline type.

University of Mosul

College of Education for Pure science



The horizontal transfer of genes for both *A. tumefaciens* and *S. meliloti* bacterium and stability of T-DNA gene expression in *Medicago sativa* plant

A Thesis Submitted to The Council of College of Education for Pure Science-University of Mosul in Partial Fulfillment of Requirements for The Degree of Ph. D. Philosophy in Biology/ Plant

Raghad Nawaf Gergees Al-Zaidy

Supervised By

Assistant Prof.

Dr. Abdullah Najim Al-Niemi

Assistant Prof.

Dr. Najwa Ibraheem Al-Barhawi

2017 A.D.

1438 A.H.