جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

التعبير الجيني لجينات *rol*-B و*rol*-C المضمنة في الذخيرة الوراثية لنبات *Arabidopsis thaliana* L.

أطروحة تقدمت بها

رشا فوزي عبد الرزاق جاسم جرجيس

إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة الموصل
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه فلسفة في
التقانات الحياتية

بإشراف

الدكتور
مزاحم قاسم الملاح
أستاذ

الدكتورة
شفاء مهدي صالح الطائي
أستاذ مساعد

1442 هـ
2021 م

الخلاصة

استحثت في الدراسة الحالية ظاهرة الأجنة الجسمية Somatic embryogenesis من الكالس المشتق من بذور نبات الأرابيدوبسس *Arabidpsis thaliana* L. على الوسط الصلب B5 المحتوي على 0.4 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ(Thidizurone). وتشكلت من زراعة الاجنة المستاصلة في وسط موراشيج وسكوك الصلب الخالي من منظمات النمو (MS0) مئتان وأربعون (240) من نبيتات الأرابيدوبسس ويعد هذا مساراً للحصول على نباتات باعداد كبيرة من أنسجة كالس بذرة واحدة. كما تم استحداث كالس أوراقه في وسط B5 + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)+0.05 ملغم لتر$^{-1}$ Kin (Kinetin) وأنتج مئة وأربعون فرعاً (140) حين نقل الكالس الى وسط التمايز B5 المحتوي على 0.4 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ (Thidizurone)+0.1 ملغم لتر$^{-1}$ (Indole-3-butyai Acid) ونجح تجذير هذه الافرع في الوسط MS + 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ فحم منشط وأقلمتها ونقلها الى ظروف الحقل وايصالها الى مرحلة انتاج البذور .وأنشئت مزارع نموذجية للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس الأوراق في الوسط B5 + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)+0.05 ملغم لتر$^{-1}$ Kin (Kinetin). وأدت زراعتها في وسط الاستحثاث بطمرها في قطرات الاكار المتعددة و القطاعات الى انقسام خلاياها وتكوين مستعمراتها الخلوية التي تطورت الى بادئات الكالس ونموها الى قطع كالس صغيرة الحجم ومن ثم تمايز منها أفرع خضرية ناتجة من الاجنة الجسمية منتجة مئة وسبعين (170) فرعاً خضرياً وجذرت بسهولة في الوسط MS0+2.0 ملغم لتر$^{-1}$ فحم منشط وأقلمتها وتحملها ظروف الحقل. وتمكنت الدراسة الحالية من ايجاد بروتوكول كفوء لإنتاج نباتات الأرابيدوبسس المحولة وراثياً باستخدام السلالة البرية من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC13332 بطريقتي التلقيح بالحقن المباشر Direct injection والزراعة المرافقة Co-cultivation. وقد استحثت الجذور الشعرية بفترة زمنية قياسية خلال 7أيام من قطع السيقان الملقحة بالحقن المباشر بلقاح كثافته الضوئية Optical Density=1.6، في مواقع التلقيح واخرى غير ملقحة بنسبة 34.1%.بينما أظهرت أختبارات تلقيح نباتات الأرابيدوبسس مع بلازميدات pRi (Root Inducing Plasmid) للسلالة البرية لبكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC13332 توافقاً تجسد في نشوء الجذور الشعرية بنسبة استحثاث 42.1% في مواقع تلقيح السيقان ومواقع اخرى متفوقة في تحمل عملية التلقيح على نظيراتها من قطع الأوراق الملقحة والبادرات الفاقدة لمجاميعها الجذرية، تمتاز الجذور الشعرية المحولة وراثياً بسلبيتها للانتحاء الارضي المتميزة بكثرة تفرعاتها ولونها الأبيض. وبعد اربعة اشهر من إدامتها في وسط WP(Woody plant) + 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA (Naphthalene acetic acid) لوحظ زيادة في اقطارها واكتسابها اللون الاخضر وتكشفت عنها نموات خضرية بلغت عشرة أفرع خضرية، وان قسماً من مزارعها بدأت بالتضخم لتكون كالس في الوسط B5+1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4D +0.05 (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) ملغم لتر$^{-1}$ Kin (Kinetin)الذي تمايز الى الاجنة الجسمية عند نقله الى الوسط B5+ 0.4 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ (Thidizurone)منتجة خمسة وثلاثين فرعاً خضرياً. وتواصلت تجارب التحول الوراثي باستخدام بلازميداتpRi من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ATCC13332 مترافقة مع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس أوراق نبات *Arabidopsis thaiana* L. في الوسط السائل B5 + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)+0.05 Kin (Kinetin) ملغم لتر$^{-1}$. وزرعت بطمرها في قطاعات وقطرات الاكار المتعددة بثلاث كثافات 39،30،27×10^5 خلية مل$^{-1}$ وتوالت انقساماتها وتكوينها المستعمرات الخلوية وتطورها الى بادئات الكالس التي تباينت أعدادها باختلاف الكثافات المستخدمة، وتطورت الاخيرة الى مزارع كالس. وشجع نقلها الى أوساط التمايز تكشف الاجنة الجسمية في الاوساط المحتوية على TDZ (Thidizurone) منتجة مائتين واربعين فرعاً خضرياً تميزت بصغر أحجامها وسهولة تجذيرها في وسط MS0 الصلب. وتأقلمت النبيتات الناتجة في غرفة الزروعات. وعززت الموجات فوق السمعية الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات pRi لمدة دقيقة واحدة و3 دقائق في انتاج اعداد كبيرة من بادئات الكالس في وسط الأدامة، B5 + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)+0.05 ملغم لتر$^{-1}$ Kin (Kinetin) وادى نقلها الى وسط التمايز B5+0.4 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ (Thidizurone) الى انتاج مئة وتسعة وسبعين فرعاً خضرياً جذرت بسهولة في وسط MS0الصلب تم نجاح اقلمتها وتحملها ظروف الحقل. ان العلامات التي ظهرت على النباتات الناتجة من كالس الجذور الشعرية المشتقة أساساً من زراعة المعلقات الخلوية مع 50 مايكروليتر من pRi تدل انها متحولة وراثياً. وفضلاً عن جميع الخصائص المظهرية الدالة على ان هذه النباتات محولة وراثياً فقد ايدت اختبارات البيولوجي الجزيئي صحة هذا الادعاء فقد عزل الحامض النووي DNA من الجذور الشعرية وكالسها، والنباتات الناتجة منه المتوقع تحولها وراثياً. وكذلك اختبارات التفاعل التسلسلي البوليمرازي Polymerase Chain Reaction (PCR) والترحيل الكهربائي لعينات الاحماض النووية المضخمة وباستعمال البادئات المتخصصة لجينات *rol* B و*rol*C المحمولة على T-DNA بلازميدات الناقل *Agrobacterium rhizogenes* ATCC13332 Wild type احتفاظ انسجة نباتات الأرابيدوبسس بهذه الجينات المسؤولة عن تكوين الجذور الشعرية المحولة وراثياً وارسالها الى ذرية هذه النباتات التي اكتسبت تغيرات مظهرية غير مألوفة في النباتات البذرية وبالذات في الازهار واعضائها الذكرية، الانثوية، أوراقها الكأسية والتويجية وأعداد البذور المتكونة

Summary

In the present study, the phenomenon of somatic embryogenesis derived from callus of the seeds of the *Arabidpsis thaliana L*. plant was induced in solidified B5 medium supplemented with 0.4 mg L^{-1} TDZ(Thidizurone). Two hundred and forty (240) plantlets were formed from the cultivation of the excised embryos in Murashige and Skoog medium free from growth regulators (MS0). This is represents a pathway for obtaining plants with large numbers from callus tissue of single-seed. *Arabidopsis* plants also produced from the differentiation of leaves callus in B5 + 1.0 mg L^{-1}, 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) + 0.05 mg L^{-1} Kin (Kinetin). In addition, one hundred forty (140) shoots were produced when the callus was transferred to differentiation medium B5 containing 0.4 mg $L.^{-1}$ TDZ (Thidizurone)+ 0.1 mg L^{-1} IBA(Indole-3-butyai Acid).The rooting of these shoots in the medium MS + 0.2 gm L^{-1} activated charcoal, acclimatization , transported to field conditions and seed production were succeded.

Typical cell suspensions cultures were established from leaf derived callus in B5medium + 1.0 mg L^{-1} 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) + 0.05 mg L^{-1} Kin(Kinetin). Moreover, the culture of the cell suspensions by embedding them in agar multiple drop arrays (MAD) and sectors in the induction medium led to the division of its cells and formation of cellular colonies which developed into callus primordial. The growth of the later produced small pieces of callus that were differentiated to somatic embryos. One hundred and seventy (170) shoots resulting from somatic embryos were easily rooted in the medium MS0 + 2.0 mg L^{-1} activated charcoal. Then, all regenerated plant were acclimatized successfully and transferred to soil.

Moreever study was capable to find an efficient protocol for the regeneration of transgenic *Arabidopsis* plants using the wild strain of *Agrobacterium rhizogenes* ATCC13332 through direct injection and co-cultivation. The hairy roots were stimulated at the inoculation sites of stem explants within 7 days of their direct injection with inoculum of an optical density of Optical Density = 1.6. The percent of

hairy root induction was 34.1%. The co-cultivation experiments of *Arabidopsis* plants with suspension of *Agrobacterium rhizogenes* ATCC13332 harboring Ri plasmids showed a compatibility represented by the initiation of hairy roots with a percent of 42.1% in the inoculation sites of the stem explant and others that are not inoculated. Stem segments were superior in bearing the inoculation process as compared to leaves and the seedlings losing their roots. This type of transgenic hairy roots is characterized by its negatively geotropism, frequent branching, and white color. After four months of maintaining it on (Woody plant)WP medium + 0.5 mg L^{-1} NAA(Naphthalene acetic acid). An increase in its diameter was observed and its color converted to green, with its proliferation to produce ten shoots. Some of the hairy root culture began to swell and initiate callus in B5 medium + 1mgL^{-1} 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) + 0.05 mg L^{-1} kin(Kinetin). In addition, somatic embryos were observed when this callus transferred to differentiation medium (B5 + 0.4 mg L^{-1} TDZ) which then produced thirty-five shoots.

Interestingly, genetic transformation experiments were continued using plasmids (pRi-DNA) of *A. rhizogenes* ATCC13332 co-cultivated with cell suspensions derived from *A. thaiana* leave's callus in liquid B5 medium + 1.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 Kin mg L^{-1}. Then culturing it by embedding in sectors and multiple drops with three densities of 27, 30, and 39 × 10^5cell ml^{-1}. The divisions of these suspension culture continued to form cellular colonies and their development into callus primordial, whose numbers varied according to the densities used, and the latter developed into callus cultures. Its transfer to differentiation media encouraged somatic embryos proliferation, especially in the media containing TDZ, and producing two hundred and forty shoots that are characterized by their small size and easily rooting in the MS0 medium. The regenerated plants were acclimatized in the culture room. On the other hand, the ultrasonic waves stimulated the co- cultivation of cell suspensions with the plasmid pRi for 1 and 3 minutes to produce large numbers of callus primordial in the maintenance medium (B5 + 1.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 mg L^{-1} Kin). Transferring them to the differentiation medium 0.4 mg L^{-1} TDZ led to regenerate one hundred and seventy-nine shoots that were easily rooted in solid MS0 medium with successful acclimatization and tolerance the field conditions. The features that appeared on the plants regenerated from the hairy root callus, which are

mainly derived from the co-cultivation of cell suspensions with 50 µl of pRi-DNA, indicates that it is genetically transformed.

In addition to all phenotypic characteristic, which indicating that these plants are genetically modified, this claim was proved by molecular biology tests. The DNA was isolated from the hairy roots and its callus, and from the regenerated plants that are expected to be genetically transformed. As well as tests of polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis of the amplified nucleic acid samples, using specific primers for the *rol B* and *rol C* genes carried on T-DNA plasmids of the *A. rhizogenes* ATCC13332 wild type. The all tests indicated that the tissues of *Arabidopsis* plants preserve these genes which are responsible for the formation of the transformed hairy roots and send them to the offspring of these plants that have acquired unusual phenotypic changes, particularly in flowers, their male and female organs, their sepals and petal leaves, and the number of seeds formed.

University of Mosul

College of Education

for Pure Sciences

GENE EXPRESSION OF *rol* B AND *rol* C THAT ARE INTEGRATED IN THE GENOME OF *ARABIDOPSIS THALIANA* L. PLANT

Rasha fawzi Abdul-Razaq Jarjes

Ph. D. Thesis

Biology\Biotechnology

Supervised by

Professor **Assist. Prof.**