جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

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

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

رغد نواف جرجيس الزيدي

بإشراف

أ.م.د. عبدالله نجم النعيمي

أ.م. د. نجوى ابراهيم البرهاوي

1438 هـ

2017 م

الخلاصة

عنيت الدراسة الحالية ابتداء، 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 والزرعية والاختبارات الكيموحيوية والبايولوجية وبنوعيها 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.

وبعد تشخيص عزلات *S. meliloti* باستعمال الاختبارات الكيموحيوية البايولوجية واختبارات الحساسية أنتخبت العزلة Rh1 في انجاز التجارب الوراثية اللاحقة، اذ اعتمد على امتلاكها او فقدانها لصفة المقاومة للمضادات الحيوية الاثنتي عشرة بوصفها دلائل وراثية لاثبات تحييدها بالاكردين البرتقالي واستعمالها بكتريا مستلمة وواهبة 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 الواهبة 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 الفلقية لهذه البادرات، فضلاً عن تكوين الافرع الخضرية عليها وبأعداد وصلت لغاية 24 فرع وبنسبة مئوية بلغت 20%، وبمرحلة واحدة وسخرت الانظمة الكفوءة كافة لاستنسال مسار التحول الوراثي في نباتات الجت بالاكروبكتريوم 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 استحثاث الاورام التاجية على قطع السيقان تحت الفلقية في 12 يوماً من الحقن، وعلى البادرات المحقونة التي امتازت الاورام المتكونة عليها بسرعة تكوينها وامتداد ظهورها الى مواقع اخرى غير ملقحة تجاوزت العقد الفلقية 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 1/2 MS 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 الانتخابية الحاوية على Rifampicin و Gentamycin وبتركيز 40، 100 بملغم/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 عُزل الحمض النووي الجينومي من انسجة الاورام التاجية وكالسها والافرع الخضرية المتمايزة عنها، ثم ضخم الحامض النووي المعزول بوساطة PCR ببادئات متخصصة للجين *rol* B المرتبط بجين المقاومة لمضاد الريفامبيسين 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 للبادئات المستعملة قياسياً علماً بان هذه الحزم لم تظهر في عينات المقارنة المضخمة. ويفسر ظهور عدد من التغايرات

المظهرية فضلاً عن الوراثية 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 الوراد ذكرها انفاً، وجاءت نتائج هذا الجانب لتكشف عن التحول الوراثي لانسجة هذه الاورام المحفزة بفعل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* بنمطيها البري والمهندس وراثيا 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.

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 transconjucant Agrobacterium and transconjucant Sinorhzobium 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.