------ مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص92-107، 2006 ------

تقانة كفوءة للحصول على نباتات عنيب الذيب *Solanum nigrum L.* المعدلة وراثياً بوساطة بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601

مزاحم قاسم الملاح شفاء مهدي صالح

وحدة التقنيات الحياتية

قسم علوم الحياة

كلية التربية

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2003/9/24 ؛ تاريخ القبول 2005/9/13)

الملخص

تهدف هذه التقنية الى تحسين نباتات عنيب الذيب *Solanum nigrum* الطبي البري المنتشر في البيئة العراقية من خلال التغيير قدر الامكان بمادته الوراثية. والتي يترتب عنها رفع محتواه من المركبات الطبية لمعروفة التي يحتويها متمثلة بمركبات القلويدات. تم التوصل بنجاح الى نظام كفوء وسريع للحصول على نباتات معدلة وراثيا من هذا الجنس النباتي باستخدام بكتريا الاكروبكتيريوم *Agrobacterium rhizogenes* R1601 المهندسة وراثياً كناقل طبيعي لاحداث التعديل الوراثي. وتعد هذه التقنية من البرامج الاولى من نوعها في مجال التقانات الاحيائية التي حصلت بمعدلات نجاح عالية ترتب عنها استجابة هذا النبات لهذه التقنية وحدوث تغيير في تركيبه الوراثي المترتب عن قيام الناقل بمنح جزء من مادته الوراثية DNA عند تداخلها مع خلايا النبات. وانعكس ذلك على تطويع الخلايا النباتية بصورة ادت الى زيادة بنائها وانتاجها للمواد والمركبات ذات القيمة الطبية.

An Efficient Technique for Obtaining *Solanum nigrum L.* Plants Via Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* R1601

Mozahim K. Al – Mallah Shifa M. Salih

Unite of Biotechnology

Department of Biology

College of Education

Mosul University

ABSTRACT

The aim of this work is to improve the medicinal plant *Solanum nigrum* which is distributed in Iraq and increase its alkaloid content . The present study succeeded in finding an efficient technique for regenerating a transformed plants via *Agrobacterium rhizogenes* .This bacteria acts as a natural vector for genetic transformation . Obviously,

this technique is considered the first one which has found a scheme for genetic transformation of *S. nigrum* plants .

المقدمة

تعتبر تقانات التلاعب بالعامل النباتي متمثلة بالخلية النباتية او النسيج او العضو النباتي من خلال ادخال عنصر وراثي اليها قد يكون الحامض النووي باكمله او جزءاً منه كالبلازميد من التقنيات المعقدة والمتبعة لتحسين النوع النباتي والتي لازالت محتكرة من قبل جهات بحثية محدودة جدا . وتعد النباتات احيانا المصدر الوحيد في الحصول على العديد من المركبات الطبية كالقلويدات او ان استخلاصها من مصادرها النباتية قد يكون محدودا بسبب العديد من العوامل المختلفة التي تشمل النمط الوراثي والبيئي للنبات اضافة الى الظروف البيئية (Nussbaumer et al., 1998).

ظهرت العديد من التقنيات الحياتية التي تهدف الى زيادة تركيز هذه المركبات الدوائية او الصناعية داخل النبات ومنها تقنية زراعة الانسجة النباتية قد تؤدي الى زيادة هذه المركبات نتيجة حدوث اختلافات في نمو وانقسام الخلايا دون حصول تغير وراثي فيها. فقد اشارت بعض الدراسات الى استخلاص المواد المخدرة الهايوسين والهايوسيامين من المزارع النسيجية لنبات الداتورة (يونس، 1997) ومركب الكابسيسن من نباتات الفلفل الحار (اليوزبكي، 1998) . يشير مفهوم التحول الوراثي الى ادخال المادة الوراثية (DNA) الى داخل الخلية وضرورة تداخلها مع المادة الوراثية للخلية المستقبلة (Warr, 1984) مسببة تعديلا في بنائها الوراثي يترتب عنه انتاج النباتات المعدلة وراثيا التى ترتقي بصفاتها عن النباتات البذرية من حيث المحتوى القلويدي (Mateus et al., 2000).

تهدف الدراسة الحالية الى الوصول الى طريقة مناسبة وكفوءة لاحداث التحول الوراثي وانتاج النباتات المعدلة وراثيا. وبالامكان الاستفادة من هذه الطريقة في انظمة نباتية طبية اخرى بهدف رفع محتواها من المركبات الدوائية او نباتات اقتصادية مهمة لغرض تحسين صفاتها الزراعية وزيادة انتاجها.فضلا عن ذلك فان العديد من الدراسات تتجه حالياً لاستخلاص بعض المركبات الفعالة من مصادرها الطبيعية نظرا لكفائتها العالية او عدم امكانية تصنيعها مختبريا او فشل المصنع منها.

المواد وطرائق العمل

اولا : الناقل البكتيري Vector

استخدمت في التقنية الحالية السلالة R1601 من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* الحاوية لبلازميد Ri (Root inducing plasmid) والذي بدوره يحمل جينات Vir - genes ، Ori – genes ، Onc- genes (Hooykas and Schilperoort, 1992) والمعلمة وراثياً بصفة المقاومة للكانامايسين Kana. R+ والكاربنسلين Carben.R+ .

(Professor. E.W. Nester and Washington., Univ USA)

ثانيا : اخضاع النظام النباتي عنيب الذيب لتقنية التحول الوراثي

1. تحضير الناقل المحدث للتحول

حضر لقاح بكتريا A. rhizogenes R1601 باستخدام 25 مل من الوسط السائل APM (Morgan et al., 1987) في دورق سعة 125 مل . وضعت العينات في الحاضنة الهزازة بسرعة 100دورة / دقيقة. حصدت البكتريا باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 1200 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة . واعيد تعليق البكتريا المترسبة باضافة 1 مل من وسط APM السائل الجديد.

2 . الطريقة المتبعة في التحول الوراثي لنباتات عنيب الذيب

استخدمت طريقة الحقن المباشربالناقل البكتيري (Jaziri et al., 1988) لقطع السيقان والاوراق المستاصلة من نباتات عنيب الذيب البري بعد تعقيمها سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl تركيز 3% مدة 25 دقيقة وغسلها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات (3 دقائق / مرة) وازيل الماء الفائض بوضعها على ورق ترشيح معقم . ثم حقنت قطع السيقان بالناقل البكتيري *A.rhizogenes* باستخدام سرنج ذات ابرة needle دقيقة ووخزت كل قطعة في اربعة مواقع.بينما لقحت الاوراق المعقمة بالناقل البكتيري عن طريق حقنها في موقعين من العرق الوسطي من السطح العلوي وموقعين اخرين في السطح السفلي بنفس طريقة تلقيح قطع السيقان . لقحت عينات المقارنة بوخز قطع السيقان والاوراق بابرة مغمورة في ماء معقم وبالطريقة عينها .

غرست القطع النباتية الملقحة بوضع قائم في وسط MS (Murashige and Skoog, 1962) الصلب الخالي من منظمات النمو وحفظت العينات في حاضنة النمو في درجة حرارة 25 ± 2 وشدة اضاءة 100 لوكس بمعدل 16 ساعة ضوء يوميا لحين ظهور الجذور الشعرية.كما جرت متابعة عينات المقارنة بالطريقة نفسها .

3 . استحداث مزارع الجذور الشعرية

استؤصلت الجذور الشعرية المتكونة على العينات الملقحة في مواقع التلقيح ونقلت الى وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في اطباق بتري قطر 9 سم او في دوارق زجاجية. حفظت العينات في ذات الظروف السابقة وبعد الحصول على مزارع جيدة منها نقلت الجذور الشعرية الى وسط MS الصلب الحاوي على تراكيز متدرجة من 100 –500 مايكرو غرام \ مل من الوسط من المضادين الحيويين Cefotaxime, Augmentin خلال بضعة نقلات متتالية على هذه الاوساط حتى الحصول على مزارع من الجذورخالية من البكتريا .

4. الحصول على النباتات المعدلة وراثيا

تواصلت اعادة زراعة الجذور الشعرية الخالية من الناقل البكتيري في وسط MS الصلب في اطباق بتري قطر 9 سم ، وحفظت في حاضنة النمو وبنفس الظروف المشار اليها سابقاً مع رفع شدة الاضاءة الى 1500 لوكس . استمرت عملية الادامة بمعدل مرة واحدة شهريا مدة سنة كاملة وبعد تكون

الافرع الخضرية نقلت الى وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو لغرض تجذيرها واقلمة النباتات الناتجة ونقلها الى التربة .

ثالثاً : التحليل الوراثي للنباتات المعدلة وراثيا

1. الترحيل الكهربائي في الكشف عن الاوبينات Opines في الجذور الشعرية

استخدمت الطريقة القياسية (Petit et al., 1983) في الكشف عن الاوبينات التي تتكون عند نجاح حدوث التحول الوراثي. وضع 100 ملغم من الجذور الشعرية الفتية في انبوبة ابندروف Eppendroff tube بوجود 100 مايكرو ليتر من الماء المقطروسحقت جيدا . نبذ المزيج مركزيا بسرعة (6000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق) تم تحميل 20 مايكروليتر من الرائق على شريط من ورق الكروماتوكرافي (Whatman 3MM) . وتحميل الحجم نفسه من عينة مسحوق الجذور الاعتيادية لنباتات عنيب الذيب البذرية (المقارنة) وعينة الاكروبين القياسي Standard Agropine (CNRS, France) . اجري الترحيل الكهربائي بوجود المحلول المنظم Buffer المتكون من (30مل حامض الفورميك بتركيز 99 % + 60 مل حامض الخليك بتركيز 99.5 % + 910 مل ماء مقطر) بفولتية مقدارها 100 فولت مدة ساعة واحدة . رفعت ورقة الكروماتوكرافيا لتجف في الهواء. واظهار البقع المفصولة باستخدام نترات الفضة القاعدية وغسل الشريط الورقي بالماء الجاري مدة 30 دقيقة ثم جففت في الهواء.

2. الكشف عن الكروسومات وحساب اعدادها في النباتات الناتجة من الجذور الشعرية

استخدمت الطريقة المعتمدة (Karp et al., 1982) مع اجراء بعض التحويرات فيها. قطعت قمم جذور هذه النباتات بطول 0.5 سم وعوملت بمحلول التثبيت المكون من الكحول الاثيلي وحامض الخليك . وضعت في محلول 1 عياري من حامض الهيدروكلوريك لمدة 15 دقيقة في حمام مائي بدرجة 60°م ونقلت الى محلول الاسيتوكارمين لمدة 24 ساعة. وضعت العينات على شريحة زجاجية مع قطرة من الصبغة وتغطيتها بغطاء الشريحة وفحصها بالمجهر الضوئي لحساب عدد الكروموسومات.

3. التقدير الكلي للحامض النووي DNA

استخدمت الطريقة المعتمدة (Cherry, 1962) لاستخلاص الحامض النووي من النباتات المعدلة وراثيا والنباتات البذرية (المقارنة) وحددت الكمية الكلية للحامض النووي DNA باعتماد طريقة Gills and Mayer, 1965) بالمقارنة مع المنحني القياسي للـ DNA الناتج من استعمال تراكيز تراوحت (1 – 10 مايكرو غرام / مل) من Calfthymus DNA القياسي.

4 . الصفات المظهرية للنباتات المحولة وراثياً

قورنت مجموعة من الصفات المظهرية لنباتات عنيب الذيب المعدلة وراثيا بمثيلاتها من النباتات البذرية ولذات الصنف البري وبنفس العمر وشملت ارتفاع النباتات وعدد الافرع الخضرية وعدد الازهار والثمار وعدد البذور /ثمرة .

جمعت الثمار الناضجة ذات اللون الاسود من نباتات عنيب الذيب المعدلة وراثيا،وزرعت بذورها مختبريا وحسبت نسبة انباتها . زرعت مجموعة من البادرات الناتجة من هذه البذور في تربة مزيجية معقمة في ظروف البيت الزجاجي لمتابعة نموها.

خامساً : استخلاص القلويدات

استخدمت الطريقة القياسية (Argolo et al., 2000) في استخلاص القلويدات من اوراق وثمار نباتات عنيب الذيب المعدلة وراثيا ،اوراق وثمار نباتات عنيب الذيب الناتجة من البذور وايضا من الجذور الشعريةالمحولة وراثيا . اخذ 50 غم من العينة النباتية وجففت عند درجة – 10 باستخدام النيتروجين السائل Liquid nitrogen وسحقت في هاون خزفي بوجود 10 مل من 0.2 عياري HCl / غم من المادة النباتية. بعدها حلل المستخلص باضافة 1 عياري من حامض HCl وبنفس النسبة السابقة لمدة ساعتين بدرجة 95 °م بالغليان المعكوس (reflux) . واضيف اليه لاحقا محلول هيدروكسيد الامونيوم NH_4OH بتركيز 25% لحين بلوغ الاس الهيدورجيني pH للمستخلص حوالي (8.5 – 9). جفف المستخلص في جهاز التبخير الدوار. اضيف الكلوروفورم الى المستخلص وباستخدام قمع الفصل عزلت طبقة الكلوروفورم الحاوية للقلويدات، اعيدت هذه العملية ثلاث مرات، ثم تبخير الكلوروفورم في حمام مائي بدرجة 50 م° ثم وزن الناتج المتبقي الذي يمثل القلويدات .

النتائج

1- التلقيح المباشر لقطع السيقان والاوراق بالناقل وتكوين الجذور الشعرية.

اظهرت النتائج قدرة قطع السيقان والاوراق على تحمل التلقيح بالحقن المباشر بالناقل البكتيري (الجدول1) مقترنا بنجاحها الواضح في استحداث الجذور الشعرية المحولة وراثيا بعد اسبوعين في مواقع التلقيح على كل من قطع السيقان (الشكل 1 ، A) والاوراق (الشكل 1 ، B) . ويشير نشوء هذه الجذور حصول التوافق التام بين النظام النباتي المستخدم والناقل البكتيري معززاً بدرجة الاستجابة العالية لتكوين الجذور الشعرية .

وامتازت الجذور الشعرية المتكونة بنموها السريع في الوسط الزرعي وتطورها الى كتلة كثيفة بيضاء اللون من الجذور غطت القطعة الملقحة بالناقل بعد 20 يوما من التلقيح (الشكل 1 ، C) . وبعد الحصول على مزارع جيدة للجذور الشعرية بعمر 30 يوما (الشكل 1 ، D). تم تخليصها من الناقل البكتيري بشكل نهائي باضافة مستويات متزايدة التركيز من Augmentin وCefotaxime الى الاوساط التي تنمو فيها واستغرقت هذه العملية ثلاثة اشهر وتم التاكد من خلوها من البكتريا بواسطةعمل مهروس من الجذور الشعرية في الوسط السائل واخذ مقدار لوب من هذا التحضير وزرعه على سطح وسط الاكار الصلب وبعد تحضينه لفترة اسبوع كامل لم يظهر أي نمو بكتيري . اتصفت الجذور الشعرية المحولة وراثيا بكثافة شعيراتها الجذرية عند فحص التحضيرات المؤقته منها بالمجهر الضوئي (الشكل E،1) مقارنة بالجذور الاعتيادية(الشكل F، 1). ومن الصفات المهمة لهذا النوع من الجذور الشعرية

المحولة وراثياً نموها السريع وشفافيتها وسلبيتها للانتحاء الارضيnegative geotropism.(الشكل1 H،)،واختلافهاعن الجذور الاعتيادية(الشكل1 ، I)،وعند نقلها في وسط MS السائل احتفظت بقابلية نموهـا السريع(الشكل1، J). كما اظهرت النتائج قابليتها على استحداث الكالس في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو (الشكل 1،K).

الجدول 1: استجابة اوراق نباتات عنيب الذيب *S. nigrum* وقطع سيقانها للحقن المباشر بالناقل *A. rhizogenes* وتكوينها للجذور الشعرية بعد اسبوعين من المعاملة.

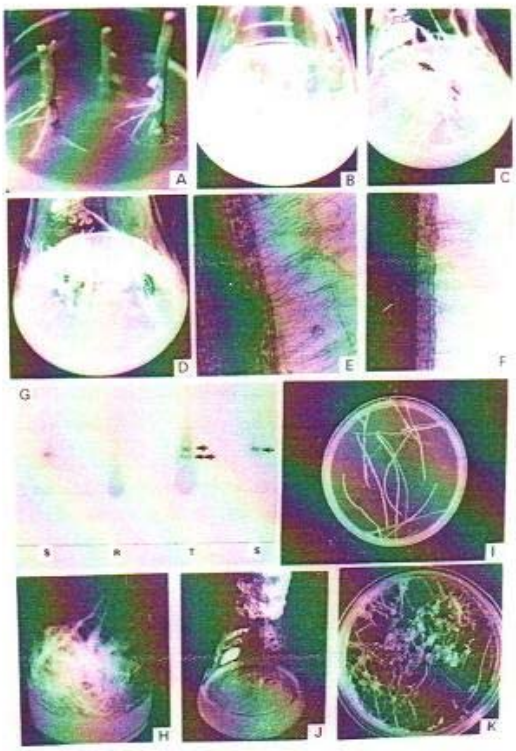
الجزء النباتي	عدد القطع المكونة للجذور الشعرية	استجابتها لتكوين الجذور الشعرية (%)	معدل عدد الجذور/ قطعة
السيقان	*60	66.6	8
المقارنة	0	0	0
الاوراق	80	88.8	15
المقارنة	0	0	0

*عدد المكررات المستخدمة 90 قطعة/ معاملة ، (المقارنة) تمثل سيقاناً واوراقاً حقنت بالماء المقطر فقط.

2- تكوين نباتات عنيب الذيب المعدلة وراثيا

من النتائج المهمة لهذه التقنية كفائتها العالية حيث مكنت الجذور الشعرية المحولة وراثيا (الشكل 2 ، A) على التكوين التلقائي للافرع الخضرية (الشكل 2 ، B) بعد 8 – 10 اشهر من الادامة الدوريـة في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في ظروف (25 °م ± 2 ° وشدة اضاءة 1500 لوكس بمعدل 16 ساعة ضوء يوميا كذلك تكونت بعض الافرع الخضرية من الجذور الشعرية غير المستاصـلة المتكونة على الاوراق الملقحة ببكتريا *A . rhizogenes* (الشكل 2، C). وبلغ عدد الافـرع الخضـرية الناتجة من الجذور الشعرية 74 نباتا . واظهرت النتائج نجاح تجذيرجميع هذه الافرع الخضرية عند نقلها الى وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو (الشكل 2 ، D) . وكثافة مجاميعها الجذرية (الشكل 2 ،E) ، وايضا نجاح اقلمتها بسهولة ونقلها الى التربة ، وعند اكتمال نضج النباتات المعدلة وراثيا لـوحظ تكون مجموعتين مختلفتين مظهريا من هذه النباتات :

المجموعة الاولى: (الشكل 2 ،F) بلغ عدد هذه النباتات (20 نباتاً).والمجموعة الثانية : (الشـكل 2 ، G) وبلغ عدد نباتاتها (32 نباتا). وسيتم لاحقاً ذكر الفروقات المظهرية بين هاتين المجموعتين من النباتات .



الشكل 1: الحقن المباشر لقطع سيقان نباتات عنيب الذيب *S. nigrum* واوراقها ببكتريا *A.* R1601 *rhizogenes* وانشاء مزارع الجذور الشعرية .

A: نشوء الجذور الشعرية على قطع السيقان بعد 15 يوماً من الحقن المباشر ببكتريا *A.* *rhizogenes* R1601 .

B: نشوء الجذور الشعرية على العرق الوسطي للاوراق بعد 15 يوماً من بالناقل *A.* *rhizogenes* R1601 .

C:الجذور الشعرية hairy roots على اوراق عنيب الذيب بعد 20 يوماً من زراعتها على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

B: مزرعة الجذور الشعرية بعد 30 يوماً على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

E: عينة من الجذور الشعرية hairy roots في (C) تحت المجهر الضوئي (X40).

F: عينة من الجذور الاعتيادية لبادرات عنيب الذيب تحت المجهر الضوئي (X40).
G: الكشف عن الاكروبين بتقنية الترحيل الكهربائي
S: الاكروبين القياسي Standard Agropine. (الجزء المؤشر)
T: الجذور الشعرية المحولة وراثياً Transformed hairy roots. (الجزء المؤشر)
R: الجذور الاعتيادية.
H: مزرعة الجذور الشعرية بعد مرور 30 يوماً من الادامة على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.
I: الجذور الاعتيادية لبادرات عنيب الذيب *S. nigrum* بعد 30 يوماً من زراعتها على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.
J: الجذور الشعرية المحولة وراثياً بعد 30 يوماً من زراعتها في وسط MS السائل الخالي من منظمات النمو (المزرعة السائلة المتحركة).
K: الكالس المستحدث من الجذور الشعرية بعد 3 اشهر من زراعتها على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

3- تحليل نباتات عنيب الذيب المعدلة وراثياً

الكشف عن الاكروبين Agropin test كدليل لحدوث التحول الوراثي

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي ايجابية الكشف عن الاكروبين وقد اثبت هذا الاختبار وجود الاكروبين في مستخلص الجذور الشعرية (الشكل1 ، G) . وهذا يعطي دلالة واضحة على حصول التحول الوراثي في هذه العينة النباتية .

حساب العدد الكروموسومي في النباتات المعدلة وراثياً

اظهرت فحوصات التحضيرات المجهرية للكروموسومات ان اعدادها تباينت كثيرا (الجدول 2) ويبلغ عددها في نباتات عنيب الذيب البذرية 24 =2n كروموسوم بينما اصبح عدد الكروموسومات في النباتات المعدلة وراثيا 32 = 2n كروموسوم في خلايا نباتات المجموعة الاولى (الشكل 2، J) وبلغ عددها 42 = 2n كروموسوم في خلايا نباتات المجموعة الثانية (الشكل 2 L،K). ان الاختلاف الواضح في العدد الكروموسومي يعطي دلالة قاطعة على حدوث التحول الوراثي .

الكمية الكلية للحامض النووي DNA في النباتات المحولة وراثياً

اظهرت نتائج عزل الحامض النووي من النباتات المحولة وراثياً زيادة محتوى النباتات المعدلة وراثيا من الحامض النووي DNA قياسا بكميته في نباتات المقارنة (الجدول 3) .

الاختلافات المظهرية في النباتات المحولة وراثياً

اظهرت النتائج وجود فروقات مظهرية واضحة بين نباتات عنيب الذيب المعدلة وراثيا وتلك الناتجة من البذورفقد امتازت افراد المجموعة الاولى من النباتات المعدلة بقصر اطوالها وصغر حجم اوراقهاوتجعدها فضلا عن قلة افرعها . بينما اتصفت النباتات المعدلة وراثيا في المجموعة الثانية بصغر مساحتها السطحية قياساً الى مساحة اوراق نباتات المقارنة مع زيادة عدد افرعها والاختزال الواضح في عدد الاوراق الكأسية والتويجية في مجموعة من ازهارها الى اربعة اوراق بدلا من خمسة كما في ازهار نباتات المقارنة (الشكل 2 ، H) . فضلا عن تضاعف عدد الازهار والثمار (الشكل 2 ، I). ويظهر الجدول (4) الاختلافات المظهرية لمجموعة من الصفات بين النباتات المعدلة وراثيا والنباتات البذرية.

الشكل2: الانتاج المباشر لنباتات عنيب الذيب من الجذور الشعرية المحولة وراثياً بوساطة الناقل *A. rhizogenes* R1601.

A: مزرعة من الجذور الشعرية المحولة وراثياً بعد 40 يوماً من زراعتها على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

B: التكوين المباشر للافرع الخضرية من الجذور الشعرية الصلب الخالي من منظمات النمو. (الجزء المؤشر)

C: التكوين المباشر للافرع الخضرية من الجذور الشعرية المتكونة في العرق الوسطي لاوراق نباتات عنيب الذيب بعد 40 يوماً من حقنها بالبكتريا.

D: تجذير الافرع الخضرية المحولة وراثياً بعد 7 ايام من نقلها الى وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو. (الجزء المؤشر)

E: نباتات عنيب الذيب المحولة وراثياً قبل نقلها الى التربة.

F: نباتات عنيب الذيب المحولة وراثياً (المجموعة الاولى) بعد 70 يوماً من نقلها الى التربة.

G:عينة من نباتات عنيب الذيب المحولة وراثياً(المجموعة الثانية) بعد 50 يوماً من نقلها الى التربة.

H: الاختلافات المورفولوجية الحاصلة في عدد الاوراق التويجية للزهرة وحجم الاوراق وعناقيد الثمار بين نباتات عنيب الذيب المحولة وراثياً (المجموعة الثانية) ونباتات المقارنة.

I: نبات عنيب الذيب في (G) بعد ثلاثة اشهر من نقله الى التربة.

J: كروموسومات خلايا طرف الجذر للنبات في (F) تحت المجهر الضوئي (400x)

K: كروموسومات خلايا طرف الجذر للنبات في (G) تحت المجهر الضوئي (400x)

L: كروموسومات خلايا طرف الجذر للنبات في (I) تحت المجهر الضوئي (400x)

زراعة بذور عنيب الذيب الناتجة من النباتات المعدلة وراثيا

اكدت نتائج زراعة البذور الناتجة من النباتات المعدلة وراثيا ان نسبة انباتها بلغت 86% وثبات حالة التحول في نباتاتها الناتجة بدلالة امتلاك النباتات الناتجة من هذه البذور صفات مظهرية مماثلة لتلك التي ظهرت اولا في النباتات المحولة وراثيا.

4- انعكاس حالة التحول الوراثي على زيادة محتوى القلويدات في النباتات المعدلة وراثيا

لقد اكدت النتائج زيادة مستوى مركبات القلويدات في نباتات عنيب الذيب المعدلة وراثيا حيث ازداد تركيزها في اوراق وثمار هذه النباتات مقارنة بتراكيزها في اوراق وثمار النباتات البذرية حيث بلغ تركيزها (14.9 ملغم / كغم) في مستخلصات ثمار النباتات المعدلة وراثيا اعقبها مستخلصات اوراق النباتات المعدلة وراثيا لتصل الى 13.1 ملغم /كغم (الجدول5).

الجدول 2 : حساب العدد الكروموسومي في قمم جذور نباتات المجموعتين الاولى والثانية من عنيب الذيب المحولة وراثيا

تسلسل النبات	نباتات المجموعة الاولى عدد الكروموسومات /خلية								المعدل ±SD	نباتات المجموعة الثانية عدد الكروموسومات /خلية								المعدل ±SD
1	32	34	36	38	38	36	36	38	**2.13 ± 36**	42	42	40	44	42	40	44	42	**1.15 ± 42**
2	36	30	38	38	40	36	34	36	**3.02 ± 36**	48	46	40	42	40	40	40	42	**3.20 ± 42**
3	32	36	34	38	36	40	38	34	**2.61 ± 36**	42	46	44	40	42	40	42	40	**1.51 ± 42**
4	34	38	38	40	34	36	38	30	**3.20 ± 36**	46	48	44	46	44	42	44	42	**2.61 ± 44**
5	32	38	36	32	32	32	32	32	**2.82 ± 34**	44	46	48	46	44	42	44	40	**3.02 ± 44**
6	34	36	36	32	32	36	32	34	**1.85 ± 34**	42	44	40	40	46	46	40	38	**2.26 ± 42**
7	36	38	36	34	38	34	36	36	**1.51 ± 36**	44	46	40	42	40	44	40	42	**3.02 ± 42**
8	38	36	36	34	36	36	36	36	**1.06 ± 36**	42	42	40	42	44	42	42	42	**0.92 ± 42**
9	38	38	36	34	36	36	34	36	**1.85 ± 36**	44	42	42	42	42	42	40	42	**1.06 ± 42**
10	36	38	36	36	36	36	34	36	**1.0 ± 36**	42	44	42	44	46	46	44	44	**2.0 ± 44**

الجدول 3: الكمية الكلية للحامض النووي DNA المعزولة من نباتات عنيب الذيب المحولة وراثياً بواسطة الناقل البكتيري *A . rhizogenes*

نوع النباتات		كمية الحامض DND µg/غم وزن طري
نباتات المجموعة الاولى المعدلة وراثيا		0.009 ± 63*
نباتات المجموعة الثانية المعدلة وراثيا		0.001 ± 96
النباتات البذرية (المقارنة)		0.003 ± 59

* الارقام تمثل معدلات القيم لثلاثة مكررات ± (SD) الانحراف القياسي

الجدول 4: الاختلافات المظهرية بين المجموعتين من نباتات عنيب الذيب *S. nigrum* المعدلة وراثياً بفعل الناقل البكتيري ونظيراتها من النباتات البذرية.

نوع النباتات	الصفات (± SD)					
	ارتفاع النبات (سم)	عدد الافرع	طول الورقة (سم)	عدد الازهار/ نبات	عدد الثمار/ نبات	عدد البذور/ ثمرة
النباتات المعدلة وراثيا (المجموعة لاولى)	1.0±10.0	0.71±3.0	1.21±2.6	2.3±11.0	0.9±4.0	1.49±11
النباتات المعدلة وراثيا (المجموعة الثانية)	1.0± *17.5	0.9 ± 20	0.81±3.1	1.0 ±297	2.1± 258	1.15±36
النباتات البذرية (المقارنة)	1.2±23.5	2.0±10.0	0.91±4.5	2.3±67.0	2±50.0	1.56±24

□ الارقام تمثل معدلات القيم لـ 15 نباتاً ± (SD) الانحراف القياسي.

الجدول 5 : التقدير الكمي للقلويدات المعزولة من المستخلصات المختلفة للجذور الشعرية المحولة وراثيا ونباتات عنيب الذيب المعدلة وراثيا

مصدر القلويدات	الوزن ملغم/كغم (وزن جاف)
الجذور الشعرية المحولة وراثيا	11.7
اوراق النباتات المحولة وراثيا	13.1
ثمار النباتات المحولة وراثيا	14.9
اوراق النباتات البذرية	10.2
ثمار النباتات البذرية	12.7

المناقشة

ان هدف الدراسة الحالية استخدام السلالة R1601 من بكتريا الاكروبكتيريـــــوم *rhizogenes A.* بوصفها ناقلاً طبيعياً لاحداث التحول الوراثي في نباتات عنيب الذيب .حيث ان الاســاس الجزيئــي للتحول الوراثي للخلايا النباتية بواسطة بكتريا الاكروبكتيريوم يتضمن انتقال المادة الوراثية منها وتداخلها في الذخيرة الوراثية لنواة الخلايا النباتية . وتمثل المادة المنقولة جزء من بلازميد Ri وتسمى T- DNA . وبعبارة أخرى تستطيع البكتريا منح قطعة من T- DNA الى الخلايا النباتية التي تصيبها واتحادها مع الذخيرة الوراثية ثم التعبير عن نوع الجين المنقول والذي تقوم نواتجه باخلال التوازن الهرموني (Fortin e .al, 1993) .وتحتوي منطقة T- DNAفي هذا البلازميد على جينات iaaM ، iaaH المسـؤولة عــن تصنيع القلويدات اضافة الى الجين المسؤول عن بناء الوبينات التي تمثل منتجــات مختلفــة للاحمــاض الامينية مع السكر والكاربون (Zupan and Zambryski, 1995).

لقد ابدى هذا النوع النباتي قدرة عالية وتوافقاً تاماً مع هذه البكتريا من خلال تحمل القطع النباتية للحقن المباشر بهذه البكتريا مقترناً بنجاحها الواضح في تكوين خصل من الجذور الشعرية المحولة وراثياً Transformed hairy root. ان تكون الجذور الشعرية وظهورها في مواقع الحقن المباشر بهذا الناقــل الطبيعي يعزى الى انتقال قطعة من الحامض DNA من بلازميد Ri الى المادة الوراثية للخليــة النباتيــة (Kunik et al., 2001). واحتواء هذه القطعة على مجموعة جينات (aux – genes) المسؤولة عن بناء الانزيمات الخاصة بانتاج الاوكسينات والسايتوكانينات داخل الخلية النباتية (Thomasshow et al., 1986).

ان الاستجابة العالية لاوراق نباتات عنيب الــذيب للتلقــيح بــالحقن المباشــر بالناقــل بكتريــا *A. rhizogenes* وتكوينها الجذور الشعرية مقارنة باستجابة قطع السيقان ربمــا يعــود الــى اخــتلاف المحتوى الداخلي لمنظمات النموفي هذه الاجزاء النباتية وتباين اعداد الخلايا التي تستجيب للتلقيح المباشر بهذه البكتريا (Kahl, 1988).

ان ازالة البكتريا الناقل الاكروبكتيريوم من مزارع الجذورالشعرية المحولة وراثياً من الخطــوات الاساسية والمهمة لتجنب التداخل الذي من الممكن ان يحصل بين الخلايا المحولة وراثيا والبكتريا والذي يؤثر بدوره في نمو الانسجة المعدلة وراثياً (Horsch et al., 1998). وتستلزم هذه العملية نقل الجذور الشعرية مرات عديدة متتالية الى مجموعة من الاوساط الحاوية للمضاد الحيوي المناسب لازالــة الناقــل بكتريا الاكروبكتيريوم تماماًمن الوسط وقد اظهرت هذه الدراســة ان اضــافة المضــادين الحيــويين Cefotaximeو Augmentine قد حقق كفاءة واضــحة فــي الــتخلص مــن بكتريــا *A. rhizogenes* والحصول على مزارع الجذور الشعرية الخالية من الناقل .

واكدت احدى الدراسات نجاح المضاد الحيوي Cefotaxime في ازالة السلالة نفسها من هذه البكتريا عند اضافته بتركيز 500 ملغم \ لتر للوسط المســتخدم فــي تحضــين بروتوبلاســت نباتــات *Solanum dulcamara*مع البكتريا (Chand et al., 1989). ان خاصية النمو السريع لهذه الجذور الشعرية ربمــا يعزى الى زيادة معدلات انقسام المرستيم القمي في قمم هذه الجذور (Mengolie et al., 1992) . امــا قابلية هذه الجذور الشعرية على استحداث الكالس في وسط MS الصلب الخالي مــن منظمــات النمــو

فيعكس حالة التحول الوراثي في هذا النبات فمن المتوقع ان يكون التغير الحاصل في تركيز الهرمونات النباتية نتيجة لانتقال قطعة T-DNA الى الخلايا النباتية قد شجع بشكل مباشر على استحداث الكالس.

ان تكون الافرع الخضرية بشكل تلقائي تعد خطوة في غاية الاهمية حيث عند عدم استخدام الناقل يستلزم الحصول على الكالس المحول وراثياً بطرق تستلزم وقتاًوجهداً كبيرين احياناً،اضافةً الى الحاجة لتداخلات مشتركة ومختلفة لمنظمات النمو المختلفة للتوصل الى استحداث مناسب ثم نقل الكالس المتكون من وسط الاستحداث الى اوساط اخرى للتمايز لانتاج الافرع الخضرية وتصبح الحالة مشابهة لانتاج النباتات المحولة وراثياً من العقد التاجية ، او عزل البروتوبلاست ومزجه ببكتريا الاكروبكتيريوم وزراعته للحصول على الكالس المحول وراثياً (Cand et al., 1989) .

ان وجود الاوبينات Opines في انسجة الجذور الشعرية يؤكد حصول عملية التحول الوراثي للنسيج النباتي المستخدم حيث تبنى هذه الاحماض الامينية غيرالاعتيادية نتيجة انتقال قطعة T-DNA منبلازميد Ri للناقل البكتيري الحاوي للجينات الخاصة ببناء هذه الاحماض (Dessaux et al., 1998) .

ان الاختلافات التي حصلت في اعداد الكروموسومات قد يعزى الى عبور وتداخل قطعة T-DNA للناقل البكتيري وتضمينها في المادة الوراثية للخلايا النباتية ، وهذا ترتب عنه زيادة محتوى هذه النباتات من الحامض النووي DNA الكلي. اما الاختلافات المظهرية التي ظهرت على نباتات عنيب الذيب المحولة وراثياً فيعود الى انتقال قطعة T-DNA من بلازميد Ri واندماجها مع المادة الوراثية لخلايا النبات وتعبير جيناتها في خلايا النبات العائل (VanAltvorst et al., 1992). ومما يؤكد هذا التفسير حصول حالة مماثلة في نباتات التبغ المحولة وراثياً باستخدام بكتريا الاكروبكتيريوم (Dehio et al ., 1993) كذلك كان تويج ازهار نباتات البطاطا *Solanum tuberosum* .والسكران *Hyoscyamus muticus* المحولة وراثياً باستخدام بكتريا *A. rhizogenes* مؤلفاً من اربع اوراق تويجية بدلاً من خمس (Oksman- Caldentey et al., 1991).

ان النتائج المتحققة في هذه الدراسة تؤكد امكانية اعتماد مزارع الجذور الشعرية مصدراًلاستخلاص المركبات الدوائية لاسيما انها تمتاز بنموها السريع وسهولة ادامتها (Meyer et al., 2000) . دون الحاجة الى متطلبات معقدة كما تتيح السيطرة على انتاجها من خلال تهيئة الظروف المثلى لغرض رفع مستواها وزيادة نقاوتها ، لقد اشارت احدى الدراسات الى استخدام مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً مصدراً لاستخلاص قلويدات Solasodine من نباتات *Solanum aviculare* (Argolo et.al ., 2000). ولوحظ في دراسة اخرى ارتفاع مستوى القلويدات الموجودة في الجذور الشعرية المحولة وراثياً المتكونة من تلقيح نباتات *Catharanthus roseus* ببكتريا *A. rhizogenes* (Parr et al., 1988). ومن الممكن مستقبلاًاجراء دراسات تتعلق بتشخيص وزيادة محتوى المركبات المعزولة من مزارع الجذور الشعرية والنباتات المحولة وراثياً وعزلها بصورة نقية .

المصادر العربية

اليوزبكي، غادة شرف الدين، 1998. محتوى فيتامين C وقلويد الكابسين في الاجزاء النباتية والكالس الناشيء منها لنبات الفلفل *Capsicum annum* (الصنف الحلو والحار) رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة الموصل.

يونس، اواب وعد الله، 1997. محتوى القلويدات في الكالس والنباتات الناتجة منه في النبات البري الداتورة *Datura innoxia* . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة الموصل.

المصادر الاجنبية

Argolo, A.C., Charwood, B.V. and Pletsch, M., 2000. The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of Solanum aviculare.Planta Med. 66: pp.448 – 451 .

Chand , P.K., Rech, E.L., Golds, T.J., Power, J.B. and Davy, M.R., 1989. Electroporation stimulates transformation of freshly isolated cell suspension protoplasts of *Solanum dulcamara* by *Agrobacterium* . Plant Cell Repts .8: pp.86- 89 .

Cherry, J.H., 1962. Nucleic acid determination in storage tissue of higher plants. Plant Physiol. 37: pp.670-678 .

Dessaux , Y., Petit, A., Farrand, S.K. and Murphy, P.J., 1998. Opines and Opine –like Molecules Involved in Plant Rhizobiaceae Interaction . In The Rhizobiaceae . Ed . Spaink et.al ., Klumer Academic Publishers, Netherlands .

Dehio, C., Grossmann, K., Schell, J. and Schmulling, T., 1993. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants over expressing the rol A genes of *Agrobacterium rhizogenes* TDNA . Plant Mol . Bio . , 23 : pp.1199- 1210 .

Fortin, C., Marquis, C., Nester, E.W. and Dion, P., 1993. Dynamic structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ti – plasmid . J. Bacteriology 175 : pp.4790 - 4799.

Giles, K.W. and Mayer, A., 1965. An improved Diphenyl Amine Reagent for estimation of DNA Concentration, Nature. 20: 93 P.

Horsch , R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eicholtz, D., Rogers, S.G. and Fraly, R.T., 1998. A simple and general method for transferring genes into plants .Sci . 277 : pp.1229 -1231 .

Hooykas, P.J. and Schilperoort, R.A., 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering . Plant Mol. Biol. 19 : pp.15 - 38.

Jaziri , M., Legros, M., Homes, J. and Vanhaelen, M., 1988. Tropine alkaloids production by hairy root cultures of *Datura sramonium* and *Hyoscyamus niger* . Phytochem . 27 : pp.419 - 420 .

Kahl, G., 1988. Architecture of Eukaryotic Genes . VCH . Weinheim .

Karp, A., Nelson, R.S., Thomas, E. and Bright, S.W. 1982. Chromosome variation in protoplast-derived potato plants. Theo. Appl. Genet. 63 : pp.265-272.

Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. 2001. Genetic transformation of Hella cell by *Agrobacterium* . Proc . Natl . Acad . Sci . U .S. A . 89 : pp.1871 -1879 .

Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P. and Oksman –Caldenty, K. 2000.Simultaneous determination of scopolamine , hyoscyaminr e and littorine in plants and different hairy root clones of *Hyoscyamus mutics* by miceller electrokinetic chromatography . Phytochem . 54 : pp.517 -523

Mengoli, M., Ghelli, A., Chiqui, D. and Bagni, N. 1992. Growth kinetic s, polyamine pattern and biosynthesis in hairy root lines of *nicotiana tabacum* Physiol . Plant. 85: pp.697 -703 .

Meyer, A.D., Tempe, J. and Costantino, P., 2000. Hairy root : A molecular overview .Plant Microb Inter. 5: pp.1-39 .

Morgan, A.J., Cox, P.N., Turner, D.A., Peel, E., Davey, M.R., Garthand, K.M. and Mulligan, B.J. 1987. Transformation of tomato using an Ri – Plasmid vector . Plant Sci. 49: pp.37 - 49 .

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: pp.473 - 497.

Nussbaumer, P., Kapetanidis, I. and Christen, P., 1998. Hairy roots of *Datura candida* XD . aurea : Effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis . Plant Cell Repts. 17: PP.405 - 409 .

Oksman –Caldentey, K.M., Kivela, O. and Hiltunen, R., 1991. Spontaneous soot organogenesis and plant regeneration from hairy rootculture of *Hyoscyamus muticus* .Plant Sci. 78: pp.129 - 136 .

Parr, A.J., Peerless, A.C. Hamill, J.D., Walton, N.J., Robins, R.J. and Rhodes, M.J.,1988. Alkaloid production by cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Repts . 7 : pp.309 - 312 .

Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Casse-Delbart, F. and Tempe, J., 1983. Further extension of the opine concept: Plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. Mol. Gen. Genet., 190: pp.204-214.

Thomasshow, M.F., Hugly, S., Buchholz, W.G. and Thomasshow, L.S. 1986. Molecular basis for the auxin – independent phenotype of crown gall tumer tissues. Sci . 231 : pp.616 - 618 .

VanAltvorst, A., Bino, R., VanDijk, A.J., Lamers, A.M., Lindhout, W., Vandermark, F. and Dons, J.J., 1992. Effect of the introduction of *Agrobacterium rhizogenes* rol genes on tomato plant and flower development. Plant Sci . 83: pp.77 - 85 .

Warr, J.R., 1984.Genetic Engineering in Higher Organisms. Edward Arnold. London.

Zupan , J.R. and Zambryski, 1995. Transfer of T –DNA from *Agrobacterium* to the plant cell . Plant Physiol. 157: pp.1041 - 1047.