Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (225-235)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

Effect of Different Concentration of Ri Plasmid on Division of Electrotreated Cell Suspension Culture derived from Stem Callus of *Vicia faba* L. Plants Embedded in Agar Multiple Drops

[1*]Sahla M. Zedan, [2]Mozahim K. Al-Malah

[1*, 2] Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E. Mail [1*] dr.sahla1953@uomosul.edu.iq, [2] mozahim.k@huc.edu.iq

(Received April 12, 2021; Accepted June 07, 2021; Available online August 28, 2021)

DOI: 10.33899/edusj.2021.168834, © 2021, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ABSTRACT

Samples of cell suspension represents seven different densities were exposed to three electrotreatment 40, 50, 60 volt and for a period of time 50, 100 msec then the densities were mixed with different concentration of Ri plasmid 25, 50, 75 Microliter. The electrotreatment samples cultured by embedding in to agar drops in solid-liquid cultures.

Results proved that the electrotreatment enhanced division of cell suspension and caused a clear increase of microcolonies, the total number of colonies reached 3276 when suspension culture was exposed to 50v / 100 msec., these colonies developed to microcalli and the percentage was 90%. The Callus developed from these colonies was light green in color and friable in texture.

Keywords: *Vicia faba*, cell suspension, cocultivation, *Agrobacterium* rhizogenes.

تأثير تراكيز مختلفة من بلازميدات Ri في انقسامات مزارع المعلقات الخلوية المعاملة كهربائياً والمشتقة من كالس سيقان نباتات الباقلاء *Vicia faba* L. والمطمورة في قطرات الاكار المتعددة.

[1*]سهلة محمد زيدان, [2]مزاحم قاسم الملاح

[1*، 2] قسم علوم الحياة, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل, الموصل, العراق

الخلاصة

عرضت مجموعة عينات من مزارع المعلقات الخلوية تمثل سبعة كثافات متباينة الى ثلاثة معاملات كهربائية 40، 50، 60 فولت ولفترات زمنية امدها 50، 100 ملي ثانية ثم مزجت هذه الكثافات المختلفة مع تراكيز مختلفة من بلازميد Ri 25، 50، 75 مايكروليتر. زرعت هذه العينات بطمرها في قطرات الاكار باعتماد المزارع الصلبة – السائلة وبرهنت نتائج هذه المزارع تشجيع انقسامات الخلايا المفردة وتكوين اعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية بلغ أقصاها 3276 مستعمرة عند تعريض مزارع المعلقات الخلوية للمعاملة

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

الكهربائية كهربائية 50V/100 msec. وتطورت هذه المستعمرات الى بادئات الكالس، اذ بلغت نسبتها 90%، واتصف الكالس المتكون في القطرات بلونه الأخضر الفاتح قوامه الهش.

الكلمات المفتاحية: *Vicia faba*, cell suspension, cocultivation, *Agrobacterium* rhizogenes

---

المقدمة

تنتمي نباتات الباقلاء *Vicia faba* L الى العائلة البقولية *Fabaceae* ضمن الفصيلة الفراشية *Papilionaceae* (1) . وتضم هذه العائلة حوالي 625 جنساً و 1800 نوع، وتعد احدى العوائل النباتية المهمة اقتصادياً فهي تضم بقوليات حبوب Grain legume غنية بالبروتين تمثل مصدراً لغذاء الانسان واخرى علفية Forage Legume تمثل مصدراً لتغذية الحيوان (2). ويضم الجنس *Vicia* انواعاً كثيرة يزرع منها في العالم 76 نوعاً لأغراض اقتصادية.

تعد المزارع الصلبة السائلة نظاماً جيداً لدراسة نمو خلايا النبات وتخصصها وهي تتكون من خلايا مفردة أو كتل صغيرة من الخلايا في وسط غذائي سائل متشابهة إلى حد ما فسلجياً وحيوياً. وقد اوضحت دراسة زراعة بروتوبلاست الجت *Medicago sativa* باتباع تقنية قطرات الاكار ان الخلايا بدأت بالانقسام خلال 72 ساعة من الزراعة وباشرت انقسامها الثاني بعد 48 ساعة من حدوث الانقسام الاول وابتدأ تكوين المستعمرات الخلوية خلال 7 ايام من الزراعة وأمكن مشاهدتها بوضوح بالمجهر الضوئي بعد 14-21 يوماً من الزراعة، وظهرت قطع الكالس في القطرات خلال اربعة اسابيع من الزراعة(3).

كما وأوضحت بعض الدراسات ان للمعاملة الكهربائية دوراً بارزاً في تشجيع انقسام خلايا المعلقات الخلوية لعدد من نباتات ذوات الفلقتين والفلقة الواحدة . فقد اشارت احدى هذه الدراسات إلى ان عمليات التثقيب الكهربائي Electroporation شجعت على نحو واضح انقسام خلايا المعلقات الخلوية للبروتوبلاست وتلك المشتقة من الكالس في نباتات ذوات الفلقة الواحدة *Pennisetum squamulatum* ولوحظ ان حيوية هذه الخلايا تراوحت بين 90-95% وبدأت عملية تشكيل الجدار ومباشرة الانقسامات الخلوية مبكراً خلال 4 ايام من الزراعة مقارنة بنظيراتها غير المعاملة التي استلزمت 7 ايام مع استمرارها بالانقسام وتكوين المستعمرات الخلوية وتطورها الى منشأت الكالس (4).

كما ان منظمات النمو المضافة الى المزارع الصلبة السائلة تشجع انقسام الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية من خلال تأثيرها في زيادة بناء DNA في البروتوبلاست المعزول مما يؤدي الى زيادة معدل الانقسامات الخلوية المتتالية وتكوين المستعمرات الخلوية والكالس وانتاج النباتات منها (5) .

فقد استغلت قدرة البكتريا (*Agrobactirum rhizogenes*) على تداخلها وتوافقها مع عدد من الانواع النباتية باستخدامها بوصفها نواقل طبيعية في عملية التحول الوراثي للنباتات. وخلال هذه العملية تنتقل قطعة من DNA البلازميد البكتيري تدعى T-DNA الى خلايا النبات العائل وتندمج مع تركيبها الوراثي (6) . ان هذه القطعة تحتوي على عدد من الجينات التي يعبر عنها Gene expression عند انتقالها في النبات العائل كما توجد جينات اخرى في مواقع أخرى من البلازميد تدعى Virulence genes وظيفتها نقل قطعة T-DNA

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

من البكتريا الى النبات ويعبر عنها في ظروف توافق معينة وبوجود مواد فينولية تحررها مجموعة من خلايا النبات في منطقة الجرح او عندما يكون الوسط حامضياً (7) .

تهدف الدراسة الحالية الى تطبيق تقنية الزراعة المرافقة Cocultivation لمزيج المعلقات الخلوية وبلازميدات Ri المعزولة من بكتريا *A.rhizogenes* من خلال تحقيق ما ياتي :

أ- عزل بلازميدات Ri

ب- التعرف على دور المعاملة الكهربائية Electroporation في انقسامات المعلقات الخلوية وتكوين بادئات الكالس بوجود بلازميد Ri .

مواد وطرائق العمل

تم الحصول على بذور الباقلاء Vicia *faba L.* (الصنف المحلي) من مركز البحوث الزراعية في نينوى.

عقمت بذور الباقلاء بغمرها في الكحول الاثيلي تركيز 96% مع التحريك المستمر مدة دقيقتين متبوعاً بغمرها في محلول القاصر التجاري هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl بنسبة 1 حجم قاصر: 2 حجم ماء مدة 30 دقيقة . رفعت البذور وغسلت جيداً بالماء المعقم اربع مرات متتالية (5 دقائق / مرة) لإزالة اثار المادة المعقمة (8).

زرعت بذور الباقلاء المعقمة سطحياً بعد ازالة غلافها على سطح 20 مل من وسط MS (9) الصلب الخالي من منظمات النمو في أنابيب اختبار بحجم 70 مل بواقع بذرة واحدة . حفظت العينات في غرفة الزرع (Culture room) في الظلام التام للايام الثلاثة الاولى وبدرجة حرارة 25 ± 2°م حتى ظهور الجذير وبداية الرويشة . بعدئذ نقلت البادرات الناتجة الى ظروف الضوء والظلام المتعاقب (16 ساعة ضوء /8 ساعة ظلام) ، وبشدة اضاءة 2000 لوكس حتى اكتمال تكوين البادرات اللازمة .

استحداث الكالس من الاجزاء النباتية

استخدمت البادرات الناتجة بعمر اربعة اسابيع مصدراً لقطع السيقان لاستحداث الكالس منها على وسط MS الحاوي على 1.0 ملغم / لتر NAA + 0.5 ملغم / لتر BA في دوارق زجاجية بحجم 100مل (10) .

انشاء مزارع المعلقات الخلوية من الكالس

اتبعت الطريقة القياسية المعتمدة (11) في انشاء المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس. أخذ 1غم من كالس السيقان الفتي الهش وبعمر 3 اسابيع ويوضع في دوارق زجاجية سعة 250 مل يحتوي كل منها على 50 مل من وسط MS . حضنت هذه المزارع في الحاضنة الهزازة (New Brunswick USA) في ظروف ظلام تامة وبدرجة حرارة 28°م وسرعة دورانية 150 دورة /دقيقة . وبعد مضي 24 ساعة تزال المزرعة وترشح من خلال منخل بلاستيكي معقم دقيق بحجم 46 m (Plant Genetic Manipulation. U.K) لازالة الكتل الخلوية غير المفككة . وأعيدت المزرعة الى الحاضنة الهزازة لاكتمال تنمية خلايا المعلق .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

تحديد كثافة المعلقات الخلوية

اخذت عينات بحجم 0.1 مل من مزرعة المعلقات الخلوية بعد مضي 24 ، 48 ، 72 ساعة من التحضين ووضعت على شريحة الهيموسايتوميتر للتعرف على نمو الخلايا و تزايد اعدادها مع عمر المزرعة (12).

تقدير حيوية خلايا المعلقات الخلوية

اعتمدت طريقة تقدير حيوية البروتوبلاست (10) باستخدام محلول صبغة Evansblue المحضرة باذابة 0.5 غرام في 100 سم^3 من الماء المقطر تم مزج محلول الصبغة بمحلول المانيتول بمقدار 3 غم/لتر . اخذ 1 مل من المعلق الخلوي ومزج مع 1 مل من محلول الصبغة. ووضع على شريحة Hemocytometer . حسب العدد الكلي للخلايا وكذلك عدد الخلايا الحية للتعرف على نسبة حيوية الخلايا.

مصدر سلالة البكتريا

تم الحصول على السلالة R1601 من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* من جامعة واشنطن (Professor E. W. Nester. Washington. Univ. U.S.A) .

تحضيروسط APM

حضر هذا الوسط باذابة مكوناته جيداً في حجم مناسب في الماء المقطر، أضيف إلى الوسط 100ملغرام/لتر من كل من المضادين الكانامايسين والكاربنسلين وصلب باضافة 15 غم/لتر من الاكار وضبط الرقم الهيدروجيني بحدود 6.6 .

عزل البلازميدات Ri

استخدمت طريقة (13) لعزل الـ DNA البلازميدي وحددت كثافة المعلق البكتيري عند قراءتها طيفياً.

تعريض مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان للمعاملة الكهربائية

اخذت حجوم معينة من كثافات مختلفة . من مزارع المعلقات الخلوية النامية في وسط MS السائل ووضعت في حجرة جهاز التثقيب الكهربائي المعقمة . بعدئذ ربطت الحجرة إلى اقطاب الجهاز , و انتخبت ثلاث فولتيات 60,50,40 فولت و لفترات زمنية امدها 50, 100 ملي ثانية (14) .

مرافقة المعلق الخلوي مع بلازميدات Ri

مزج المعلق الخلوي المشتق من الكالس الهش وبكثافات مختلفة والنامي في الوسط السائل (MS + 1.0 ملغرام/لتر NAA + 0.5 ملغرام/لتر BA) مع بلازميد Ri وقد اختبرت تراكيز البلازميد 25 ، 50 ، 75 مايكروليتر وبكثافة 36.355 ملغرام/مل.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

زراعة المعلقات الخلوية المعاملة كهربائيا والمرافقة ببلازميدات Ri

اخذ 1 مل من مزرعة المعلق الخلوي المشتق من الكالس وبكثافة 6.4×10^3، 8.8×10^3، 8.2×10^3 ، 7.0×10^3 ، 4.9×10^3 خلية/سم^3 والتي سبق تعريضها إلى تأثير فولتيات 40 ، 50 ، 60 فولت ، مزج هذا الحجم من هذه المزرعة مع تركيز 25 مايكروليتر من بلازميد Ri وبعد مزجهما مباشرة اخذ هذا المزيج واضيف اليه 1 مل من 3% من محلول الاكار المعقم السائل بدرجة حرارة 45 مْ . وزع المزيج بصورة قطرات متماثلة الحجم باستخدام ماصة معقمة حجم 1 مل وضعت في قعر اطباق بتري البلاستيكية قطر 9 سم على هيئة قطرات مركزية واخرى محيطية يتراوح مجموعها 20 قطرة /طبق تركت الاطباق لكي تجف في كابينة الزرع ، اضيف إلى القطرات بعد تصلبها 3 مل من الوسط السائل نفسه ، غلقت الاطباق وتركت في ظروف غرفة الزرع المذكورة سابقا .

ادامة مزارع قطرات الاكار المتعددة واستحداث الكالس

تمت ادامة مزارع قطرات الاكار المتعددة ولكافة المعاملات المستخدمة كل اربعة ايام وذلك بسحب الوسط القديم باستخدام ماصة معقمة (Quick Pette-F) حجم 1 مل والتعويض عنه بنفس الكمية من الوسط السائل الجديد المعقم ذاته مع تحريك الطبق بهدوء ليتم انتشار الوسط السائل في الطبق كله مع مراعاة عدم غمر القطرات بالوسط ، ان تجديد الوسط يشجع انقسام الخلايا واستمرارها بالنمو .

النتائج

زراعة المعلقات الخلوية المعاملة كهربائيا والمرافقة ببلازميد Ri بتركيز 25 مايكروليتر

اظهرت نتائج زراعة كثافات مختلفة 6.4×10^3 ، 8.8×10^3 ، 8.2×10^3 ، 7.0×10^3 ، 4.9×10^3 من المعلقات الخلوية والتي تراوحت حيويتها بين 83-91% المعرضة مسبقا للمعاملة الكهربائية والمحضنة كل منها بعدئذ مع 25 مايكروليتر من بلازميد Ri في الوسط الصلب (MS+ 1.0 ملغرام/لتر NAA + 0.5 ملغرام/لتر BA) بتقانة قطرات الاكار المتعددة انها شجعت انقسامات خلايا المزرعة . فقد بدأت الخلايا المعرضة انقسامها الاول عند اليوم الرابع من زراعتها ودخلت هذه الخلايا المنقسمة انقسامها الثاني بعد 48 ساعة من حدوث الانقسام الأول (الشكل a.1) وواصلت الخلايا المنقسمة تكوينها مرحلتي ثلاثية ورباعية الخلايا خلال الاسبوع الاول من زراعتها (الشكل b.1) وظهرت اولى المستعمرات الخلوية بعد 14-25 يوما من الزراعة (الشكل c.1). ومن النتائج المميزة لهذه المعاملة انها شجعت تكوين اعداد كبيرة من المستعمرات خلال 21 يوما منتجة منشأت الكالس بهيأة كتل صغيرة الحجم بيضاء اللون أمكن ملاحظتها بالعين (الشكل d.1) تمكنت خلال مدة 14 يوما مع استمرار ادامتها من النمو والزيادة في الحجم إلى قطع صغيرة من الكالس (الشكل e.1). ان تعريض المعلقات الخلوية للمعاملة بـ 50V/50msec والمعاملة 50V/100msec والمحضنة مع 25 مايكروليتر شجعت حصول زيادة في اعداد المستعمرات الخلوية المتكونة اذ بلغ اقصاها 3012 مستعمرة وادى نشوء 480 بادئة كالس، لقد بلغت نسبة تكوين منشأت الكالس في المعاملتين اقصاها 87% عند اقصى كثافة مستخدمة قياسا إلى عينة المقارنة اذ بلغت نسبة تكوينها 69% (الجدول 1) اما المعاملات 40V/100msec و60V/50msec و60V/100msec فقد شجعت زيادة في اعداد المستعمرات الخلوية ولكن بنسبة

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

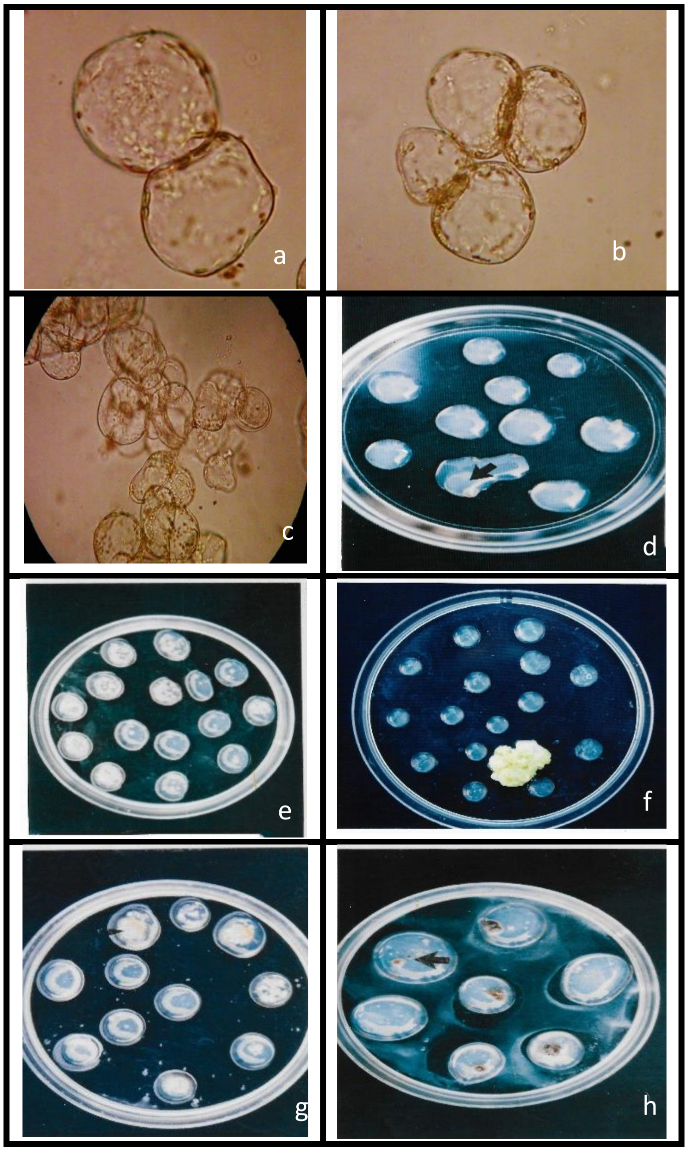
اقل من المعاملتين السابقتين وبلغت نسبة تكوين الكالس فيهما 80% و 80% و 78% على التوالي (الجدول 1) . وتمكنت خلايا المعلق الخلوي غير المعاملة كهربائيا من دون اضافة البلازميد من تكوين منشأت الكالس بعد 90 يوما . في حين لوحظ في مزرعة المعلقات الخلوية المعرضة للمعاملة 50V/50msec وبوجود البلازميد تفوقها في اعداد منشأت الكالس المتكونة واتصف الكالس بلونه الاخضر الفاتح (الشكل f.1) وتكونه بعد 50 يوما من الزراعة وادت عملية تعريض المعلق الخلوي للمعاملة 50V/100msec إلى تبكيرها في تكون الكالس مع انخفاض يعتبر بسيط في اعداد المنشأت المتكونة . واظهرت المعاملة 40V/100msec تاثيرا مماثلا في خفض اعداد المنشأت المتكونة على الرغم من التبكير في تكوينها. وعند استخدام الفولتية 60V في تعريض المعلقات الخلوية مع تباين مدة التعريض 50V/100msec اظهرت تاثيرا متناظرا في احداث انخفاض في اعداد المنشأت المتكونة قياسا إلى المعاملات الاخرى ولكنها تفوقت عن معاملة المقارنة .

الجدول (1) : تكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية المعاملة كهربائيا والمضاف اليها 25 مايكروليتر من بلازميدات Ri في وسط MS الصلب المدعم 1.0 ملغرام/لتر NAA + 0.5 ملغرام/لتر BA بتقانة قطرات الاكار المتعددة .

المعاملة	كثافة المعلق المزروعة ($\times 10^3$ خلية/سم^3)		تركيز البلازميد المضاف (مايكروليتر)	العدد الكلي للقطرات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات المتكونة	العدد الكلي للقطرات المستحدثة للكالس	العدد الكلي لمنشأت الكالس المتكونة	تكوين منشأت الكالس (%)
المقارنة (بدون معاملة)	7.8	+	0	135	102	93	97	69
40V/100msec	6.4	+	25	126	1681	101	205	80
50V/50msec	8.8	+	25	148	3012	130	480	87
50V/100msec	8.2	+	25	132	2488	115	370	87
60V/50msec	7.0	+	25	140	2080	113	230	80
60V/100msec	4.9	+	25	128	2144	101	264	78

القيم الواردة في الجدول تمثل مكررات معدلات اربع مكررات لكل معاملة .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/



شكل (1): تكوين بادئات الكالس من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان نباتات الباقلاء *Vicia faba*

a) خليتين بنويتين متساويتين في الحجم.
b) الخلايا الرباعية.
c) المستعمرات الخلوية.
d) بادئات كالس بيضاء اللون.
e) زيادة في حجم بادئات الكالس.
f) بادئات كالس اخضر مائل للأبيض.
g) بادئات كالس اخضر فاتح.
h) بادئات كالس اخضر مصفر.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (225-235)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

بوجود بلازميد Ri بتركيز 50 مايكروليتر

اظهرت نتائج زراعة كثافات مختلفة 4.2×10^3 ، 9.3×10^3 ، 10.9×10^3 ، 7.6×10^3 ، 7.0×10^3 من المعلقات الخلوية وكانت حيويتها 80% ، 92% ، 90% ، 90% ، 88% على التوالي التي سبقت معاملتها كهربائيا لمدد مختلفة 50 ، 100 ملي ثانية اعقبها تحضينها مع بلازميد Ri بتركيز 50 مايكروليتر استجابة مزارع المعلقات الخلوية للانقسام فقد بدأت جميع العينات للمعاملات كافة مباشرتها بالانقسام الاول بعد 4 ايام من الزراعة اعقبها دخول تلك الخلايا انقسامها الثاني بعد 48 ساعة من حدوث الانقسام الاول كما تكونت المرحلتان ثلاثية ورباعية الخلايا بعد مرور 7 ايام على الزراعة . وتمكنت الخلايا المنقسمة من مواصلة انقساماتها المتتالية التي نشأ عنها تكوين المستعمرات الخلوية الصغيرة خلال مدة 14–21 يوما من بدء الزراعة. ان تعريض مزارع المعلقات الخلوية للمعاملة 50V/100msec كان لها تأثير مشجع في تكوين اعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية ومنشأت الكالس اذ بلغ العدد الكلي للمستعمرات الخلوية 3276 مستعمرة ومنشأت الكالس 510 أي بنسبة 90% قياسا بعينة المقارنة اذ بلغ العدد الكلي للمستعمرات 90 مستعمرة فضلا عن تكوين 78 بادئة أي بنسبة 69% (الجدول 2) . لقد تطورت هذه المستعمرات في عينة المقارنة ونتج عنها بعد 90 يوما من بدء الزراعة حتى صار بالامكان رؤيتها بالعين المجردة. كما اظهرت مزارع المعلقات الخلوية المعاملة كهربائيا بفولتية 50 فولت لمدتين زمنيتين 50 ملي ثانية و100 ملي ثانية والمضاف اليهما 50 مايكروليتر من بلازميد Ri والمزروعة بتقانة قطرات الاكار تحفيزا متناظرا في اعداد منشأت الكالس المتكونة في كليهما قياسا إلى عينة المقارنة . وامتاز كالسها بلونه الاخضر الفاتح (الشكل g.1)، في حين اظهرت مزارع المعلقات الخلوية المعرضة لفولتية 60 فولت ولمدد زمنية امدها 50 ملي ثانية ، 100 ملي ثانية تاثيرا مشجعا في زيادة اعداد المنشأت ولكن بدرجة اقل من تاثير المعاملتين السابقتين على الرغم من تفوقها على معاملة المقارنة . وقد ادت المعاملة 40V/100msec إلى احداث انخفاض واضح في اعداد المنشأت المتكونة لكنها امتازت بكبر حجمها.

الجدول (2) : تكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية المعاملة كهربائيا والمضاف اليها 50 مايكروليتر من بلازميدات Ri في وسط MS المدعم 1.0 ملغرام/لتر NAA + 0.5 ملغرام/لتر BA بتقانة قطرات الاكار المتعددة .

المعاملة	كثافة المعلق المزروعة ($\times 10^3$) خلية/سم^3		تركيز البلازميد المضاف (مايكروليتر)	العدد الكلي للقطرات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات المتكونة	العدد الكلي للقطرات المستحدثة للكالس	العدد الكلي لمنشأت الكالس المتكونة	تكوين منشأت الكالس (%)
المقارنة (بدون معاملة)	7.0	+	0	124	90	86	78	69
40V/100msec	4.2	+	50	115	2080	87	250	76
50V/50msec	9.3	+	50	122	3032	109	430	89
50V/100msec	10.9	+	50	112	3276	101	510	90
60V/50msec	7.6	+	50	118	2850	118	360	84
60V/100msec	7.0	+	50	103	2520	103	320	82

القيم الواردة في الجدول تمثل مكررات معدلات اربع مكررات لكل معاملة .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (225-235)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

بوجود بلازميد Ri بتركيز 75 مايكروليتر

اظهرت نتائج زراعة خمس كثافات 5.9×10^3 ، 7.4×10^3 ، 6.3×10^3، 6.8×10^3 ، 6.0×10^3 خلية/سم^3 من المعلقات الخلوية تراوحت حيويتها بين 80– 83% التي سبق تعريضها لفولتيات مختلفة والمرافقة مباشرة ببلازميد Ri بتركيز 75 مايكروليتر توافق خلايا مزارع المعلقات الخلوية مع هذه التقنية ، فقد بدأت الخلايا المعرضة والمحضنة مع البلازميد انقسامها الاول بدءا من اليوم الخامس للزراعة ودخلت انقسامها الثاني بعد 14 يوما من تكوينها مرحلتي ثلاثية ورباعية الخلايا . لقد نجحت الخلايا المنقسمة من مواصلة انقساماتها المتعاقبة وانتجت بعد 25 يوما من زراعتها اعدادا من المستعمرات المتكونة والتي شوهدت مجهريا وتمكنت اغلبية هذه المستعمرات المتكونة من النمو مكونة منشأت الكالس واستغرقت 21 يوما لتكوينها ، فضلا عن ان النتائج قد اشارت إلى دور الكثافة المستخدمة ذلك ان الكثافة 7.4×10^3 خلية/سم^3 شجعت تكوين اكبر عدد من المستعمرات الخلوية بلغ عددها الكلي 2470 مستعمرة والتي تطور عنها تكوين 360 قطعة من منشأت الكالس مقترنة بالتأثير المسبق للمعاملة 50V/50msec لتصل نسبة تكوين المنشأت إلى 84% قياسا إلى نسبة تكوينها من نظيراتها اذ بلغ العدد الكلي لمنشأت الكالس 88 بادئة أي بنسبة 68% لعينة المقارنة (الجدول 3) .

وقد تمكنت المستعمرات الخلوية المتكونة في معاملة المقارنة من النمو وتكوين منشأت الكالس بعد 90 يوما من زراعتها . وامتاز كالسها بلونه الاخضر المصفر (الشكل h.1) وقلة اعداد هذه المنشأت. لقد شجعت عملية تعريض المزارع الخلوية لكلا المعاملتين 50 و 60 فولت وللمدة الزمنية نفسها التي امدها 50 ملي ثانية والتي اعقبتها اضافة البلازميد اليها حصول تزايد في اعداد منشأت الكالس المتكونة مع ملاحظة كبر حجمها في المعاملة الاولى 50V/50msec وصغر حجمها في المعاملة الثانية 60V/50msec.

وانفردت المعاملة 50V/100msec في تشجيعها اعداد منشأت الكالس الصغيرة الحجم وعلى نحو مماثل تشابهت كلا المعاملتين 40V/100msec ، 60V/100msec في خفض اعداد منشأت الكالس المتكونة قياسا إلى المعاملات الأخرى (الجدول 3) على الرغم من تفوقها على عينة المقارنة فضلا عن الزيادة الواضحة في احجام هذه المنشأت عن حجومها في المعاملات الاخرى .

الجدول (3) : تكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية المعاملة كهربائيا والمضاف اليها 75 مايكروليتر من بلازميدات Ri في وسط MS الصلب المدعم 1.0 ملغرام/لتر NAA + 0.5 ملغرام/لتر BA بتقانة قطرات الاكار المتعددة .

المعاملة	كثافة المعلق المزروعة ($\times 10^3$) خلية/سم^3)		تركيز البلازميد المضاف (مايكروليتر)	العدد الكلي للقطرات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات المتكونة	العدد الكلي للقطرات المستحدثة للكالس	العدد الكلي لمنشأت الكالس المتكونة	تكوين منشأت الكالس (%)
المقارنة (بدون معاملة)	5.6	+	0	132	100	90	88	68
40V/100msec	5.9	+	75	120	1150	85	194	71
50V/50msec	7.4	+	75	135	2470	114	360	84
50V/100msec	6.3	+	75	102	1520	75	255	74
60V/50msec	6.8	+	75	113	1665	87	286	77
60V/100msec	6.0	+	75	132	1329	94	240	71

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

القيم الواردة في الجدول تمثل مكررات معدلات اربع مكررات لكل معاملة .

المناقشة

اوضحت نتائج هذه الدراسة امكانية الحصول على مزارع الكالس من السيقان مع التغلب على مجموعة من الصعوبات التي تصاحب تكونه متمثلة بمعاناته من ظاهرة تلونه باللون الاسود بعد بضعة اسابيع من تكونه مسببة موت اجزاء منه . واشارت دراسة مماثلة الى تكون مزارع الكالس من اوراق وسيقان نباتات الباقلاء (8) في وسط الاستحداث MS المدعم بتداخلات من BA ، NAA ، بمعنى ان تكوين الكالس من الجزء النباتي يتأثر بالمحتوى الداخلي من الهورمونات في هذا الجزء وبالاضافات المتحققة في الوسط الغذائي. وقد اشارت نتائج هذه الدراسة الى نجاح استخدام وسط MS , السائل في انشاء المعلقات الخلوية على الرغم من تفوق وسط MS واحتفاظ الخلايا باعلى حيوية لها . ان الكالس الذي تم الحصول عليه في هذه الدراسة بواسطة زراعة المعلقات الخلوية بطريقة الطمر في الاكار (15) ابدى مساراً اعتيادياً في نموه وتمكن من الزيادة في الحجم من دون ان يعاني من ظاهرة الاسوداد التي ترافق الكالس المشتق من الجزء النباتي . ان الزيادة الحاصلة في نسب الانقسامات وتكوين المستعمرات الخلوية وانتاج المئات من بادئات الكالس المتكونة بفعل مرافقة تركيز معين من بلازميد Ri لكثافة معينة من المعلق الخلوي قد تعزى الى تاثير انتقال T–DNA من البلازميد وتداخلها بنجاح مع المادة الوراثية في خلايا المعلقات الخلوية (16) ومن الجدير بالذكر ان عملية انتقال T–DNA من البلازميد Ri الى داخل الخلية النباتية تتم عبر سلسلة من الاحداث تبدأ بالانجذاب الكيميائي للحامض DNA نحو الخلايا المعزولة او الحرة بفعل عدد من المواد التي تفرزها الخلية والتي تؤدي الى تنشيط مجموعة جينات Vir–gene بنوعيها VirA وVirG يتبع ذلك تنشيط مجموعة اخرى من الجينات VirB ،VirC ،VirD ، VirE (17) لتنتهي بانفصال قطعة T–DNA الى نواة الخلية لتندمج مع مادتها الوراثية على شكل نسخة مفردة Single copy او عدة نسخ Multiple copies مناظرة لانقسام الخلية النباتية التي تتواجد فيها (18) . ان تقانة الزراعة المرافقة Cocultivation تعد من التقانات الحديثة وتستلزم مزج خلايا المعلقات الخلوية او البروتوبلاست مع البكتريا او بلازميداتها (10).

المصادر

1. Das, A.B.; Pattnaik, M.; Thangaraj, T. and Das, P. (1997). Cytophotometric estimation of nuclear DNA content and karyotype analysis of eight cultivars of *Trigonella foenum graecum*. Cytobio. 91: 171-179.

2. Trinh, T.H.; Ratet, P.; Kondorosi, E.; Durand, P.; Kamate, K.; Bauer, P. and Kondoros (1998). Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago tranculata* and *M. sativa* spp. Falcata lines improved in somatic embryogenesis. Plant Cell Repts., 17: 345-355.

3. Cocking, E.C. and Davey, M.R. (1980). Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 99: 261-270.

4. Cocking, E.C. and Davey, M.R. (1988). Electroporation and heat shock stimulate division of protoplasts of *Pennisetum squamulatum*. Plant Physiol., 133: 547-459.

5. Elibio L.R. Sergio J.O. Pradeep K.C ; Michael R.D ; Bernard J.M and John B.P (1988). Electroporation increases DNA synthesis in cultured plant protoplasts. Biotechnology, 6: 1090-1993.

6. Hansen, G. and Wright, M.S. (1999). Recent advance in the transformation of plant. Trends Plant Sci., 4 : 226-231 .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

7. Al-Niama, K. Sh. (2013). Electrical fusion between protoplast of two species of *Beta vulgaris* and interaction of seedling with bacteria GUS-Labelled Gluconacetobacter diazotrophicus GUS gene. PHD thesis Biology Dep. Education collage - Mosul university.

8. Fakhrai, H. and Evans, P.K. (1989). In vitro culture and plant regeneration in *Vicia faba* subsp. Equina (Var. Spring Blaze). J. Exp. Bot., 40: 813-817.

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

10. Zedan S. M. (2004). Cocultivation of callus cell suspension with Ri plasmid for obtaining transformed Broad Bean plant. Ph. D. thesis. university of Mosul, Education Collage Biology Department.

11. Morris, P. and Fowler, M.W. (1981). A new method for the production of fine plant cell suspension culture. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., 1: 15-24.

12. Zedan, S. M. and Rasheed, J. H. (2013). Callus Cultures derived from electrotreated cell suspension of *Dianthus caryophyllus* L. embedded in ager drops express their totipotency.

13. Brinboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res., 7: 1513-1523.

14. Al-Mallah, M.K. (2002). Invention of electroporator (Al-Jihad 1) and its applications in plant tissue culture. Patent system 3033. Office of standardization and quality control.

15. Dixon, R.A. (1985). Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL. Press. Oxford. U.K.

16. David, C. and Tempe, J. (1988). Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Repts., 7: 88-91.

17. Sundberg, C.D. and Rean, W. (1999). The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein vir E1 interacts with vir E2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. J. Bacteriol., 21: 6850 (C.F. Wei et al., 2000).

18. Zambryski, P.C. (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol., 43: 465 (C.F. (Wei *et al*., 2000).

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/