الفعالية البايولوجية لعديد السكريات الدهنية،في تحسين نمو بادرات النفل الأبيض المقطوعة المجموع الجذري أو الخضري المحولة وراثيا ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601♦

نجوى إبراهيم خليل
قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل

عمر عبد العزيز الزهيري
قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة دهوك

Abstract

This investigation has attempted to study the effects of inoculation of removal shooting and rooting of *trifolium repens* seedling with *Agrobacterium rhizogenes* , which is resistant and sensitive to antibiotics kanamycin and cefotaxime respectively , on the number and length of branched shoots, length of root and protein content of these seedlings compared to the intact and non-inoculated seedlings as control sample In solid filed MS medium supplemented as individual or interacted with these antibiotics and lipopolysaccharide isolated from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, specialized to infect and formation fixed root nodules on white clover. The results have shown that the lipopolysaccharide and antibiotics cefotaxime, have improved a general effect on the protein content (22.8 and23.3 g/l),and on the mean values of the shoot length (58 and48 mm)and their branched (6.8 and 7 branch/plant), of the removal root and shoot seedlings, respectively , whereas the means of root lengths have been less than the control sample.

الخلاصة

تم في هذا البحث دراسة تأثير تلقيح بادرات النفل الأبيض *Trifolium repens* المقطوعة المجموع الجذري والمجموع الخضري ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 المقاومة للمضاد الحيوي Kanamycin والحساسة للمضاد الحيوي Cefotaxim، على أعداد وأطوال أفرع المجاميع الخضرية وأطوال المجاميع الجذرية والمحتوى ألبروتيني لهذه البادرات، قياسا بالبادرات السليمة وغير الملقحة كعينة مقارنة، في وسط MSM/2 الصلب المدعم بشكل منفرد أو متداخل بالمضادات الحيوية المذكورة أعلاه مع عديد السكريات الدهنية المعزولة من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU 536 المتخصصة بإصابة وتكوين العقد المثبتة للنيتروجين الجوي على نبات

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

النفل الأبيض. تبين إن إضافة عديد السكريات الدهنية، حسّن وبشكل عام من المحتوى ألبروتيني لهذه البادرات (22.8 و 23.3غم/لتر) ومن معدل ارتفاع المجاميع الخضرية (58 و48 ملم) وأعداد أفرعها (6.8 و 7.0 فرع/نبات) عند تداخله مع المضاد الحيوي Cefotaxim، للبادرات المقطوعة المجموع الجذري والمقطوعة المجموع الخضري على التعاقب، إلا إن معدلات أطوال المجاميع الجذرية لها كانت اقل من عينة المقارنة.

المقدمة

تضم عائلة Rhizobiaceae جنسين رئيسين من البكتريا هما: جنس *Rhizobium* وجنس *Agrobacterium* (1) ،ينتج جنس *Rhizobium* دلائل متخصصة ذات طبيعة كاربوهيدراتية أثناء علاقتها التعايشية مع النباتات البقولية تعرف بعوامل تكوين العقد Nodulation (nod)factors (2) وتسمى Lipo-poly saccharides (LPS) (3)، التي يتماثل تركيبها الاساسي في كل انواع الرايزوبيا والمتكون من 4-5 وحدات متكررة من سكر الكلوكوز أمين المرتبطة مع بعضها البعض الأخر بواسطة-β-1,4-linked-N-acetyl D-glucosamine (GlcNAc)(4) تمثلت فعاليتها البايولوجية بقدرتها على تكوين عقد جذرية كاذبة عند التراكيز المنخفضة منها على النباتات البقولية بفعل إحداث تغيرات في التوازن الهرموني نتيجة لغلقها مسار الانتشار القطبي للاوكسين(5)، في حين تمتاز الأنواع البكتيرية ألعائده إلى جنس *Agrobacterium* بقدرتها على إصابة النباتات من ذوات الفلقتين عن طريق نفاذها من خلال الجروح المتكونة على جذور وسيقان هذه النباتات مسببه لها أمراضاً مختلفة (6)، منها مرض الجذور الشعرية Hairy roots الذي تسببه بكتريا *A. rhizogenes* بفعل امتلاكها للبلازميد(Root-inducing plasmid (Ri-plasmid الذي يصل وزنه ألجزيئي الى أكثر من 100 Kb (7) والمتكون من قطعة (T-DNA) Transferred DNA حجمها مابين15-30 Kb تحمل جينات تشفر لبناء أحماض امينية غير اعتيادية منها Opine (8) ،مع جينات Oncogenecity (Onc)genes المسئوله عن الانقسام غير الطبيعي لخلايا النبات المصابة بالبكتريا بسبب إنتاجها الذاتي من Cytokinin,Auxin (9).

تهدف الدراسة الحالية الى تحسين نمو بادرات النفل الأبيض المقطوعة المجموع الخضري أو الجذري ، والمحولة وراثيا ببكتريا *A. rhizogenes* R1601 في الوسط الغذائي الصلب MSM/2 ، المدعم بعديد السكريات الدهنية LPS المعزول من بكتريا

Rhizobium leguminosarum biovar *trifolii* ANU536 متداخلا مع المضادين الحيويين Cefotaxim و Kanamycin.

المواد وطرائق العمل

بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* ومصدرها

تم استخدام بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* السلالة R1601 المهندسة وراثيا بالبلازميد الحامل لصفتي المقاومة للمضادين الحيويين (Car^R) Carbenicillin و (Kan^R) Kanamycin والحساسة للمضاد الحيوي (Cef^S) Cefotaxim والتي تم الحصول عليها من الباحث Prof. Dr. Nester E. G.، جامعة واشنطن-الولايات المتحدة الأمريكية.

تحضير لقاح بكتريا *A. rhizogenes* R1601

نقلت مستعمرة واحدة من المستعمرات النامية على سطح وسط APM (10) الصلب الى دورق زجاجي سعته 50 مل يحتوي على 20 مل من وسط APM السائل المدعم بالمضادين الحيويين Car و Kan (100 ملغم/لتر)،وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة عند درجة حرارة (28°±2م) لمدة (72 ساعة) وفي ظروف الظلام التام، رسبت البكتريا بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، علقت البكتريا المترسبة في (1 مل) من وسط APM السائل المعقم وتم حساب عددها البالغ حوالي 2-3×10^8 خلية بكتيرية/مل).

بكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ومصدرها

تم استخدام بكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* السلالة ANU 536 والتي تم الحصول عليها من Prof. Dr.Cokining E.C مركز تثبيت النتروجين الجوي- جامعة نوتنكهام- المملكة المتحدة .

استخلاص عديد السكريات الدهنية Loip-polysaccharides (LPS) من بكتريا *R. leguminosarum.* bv. *trifolii*

اعتمدت طريقة Ervin وHubbell(11)، في استخلاص عديد السكريات الدهنية من هذه من هذه البكتريا مع إجراء تحوير عليها،وذلك بإضافة 1% من المادة المخلبية Na_2-EDTA إلى مزرعة البكتريا النامية في وسط Yeast Extract Mannitol (YEM) السائل (12) قبل الاستخلاص مع التحريك المستمر لمدة نصف ساعة لضمان الاستخلاص الكامل لمركب LPS الذي يجمع بشكل كتلة مخاطية القوام، ثم اجري له فرز غشائي بأكياس الديلزة (Dialysis Sac) ضد الماء المقطر لمدة (72 ساعة) مع استبدال الماء المقطر كل 3 ساعات.

انتاج بادرات النفل المعقمة

استخدمت بذور نبات النفل الأبيض (White clover) *Trifolium repens*.L ، التي تم الحصول عليها من الأسواق المحلية,عقمت البذور تعقيما سطحيا بغمرها في كل من الكحول الاثيلي (Ethyl alcohol) بتركيز (96%) لمدة (1–2 دقيقة) والمحلول المعقم (3%) هايبوكلورايت الصوديوم (NaOCl) لمدة (15 دقيقة) مع الغسل الجيد بعد كل معاملة ثلاثة مرات متتالية بالماء المقطر المعقم لإزالة أثار الكحول والمادة المعقمة على التوالي، ثم نقلت الى سطح ورق الترشيح المعقم لغرض تخليصها من الماء العالق بها ، ووزعت على سطح وسط Nitrogen Free (NF) medium الصلب (13) في أطباق بتري معقمة قطرها 15 سم وبمعدل (100 بذرة / طبق) ، غلقت الأطباق بالبارفلم وحضنت في حاضنة النمو بشكل عمودي في ظروف الظلام التام بدرجة حرارة 25 ± 2°م ، لمدة 24 ساعة، ثم نقلت عند ذات الدرجة الحرارية الى نظام ظروف الإضاءة والظلام التعاقبي (16 ساعة ضوء/ 8 ساعات ظلام) عند شدة إضاءة 2000 لوكس، لمدة 5 أيام .

اصابة بادرات النفل البيض ببكتريا *A. rhizogenes* R1601

تم اصابة بادرات نبات النفل التي بعمر (5 أيام) بحملة لوب من لقاح بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 باستخدام تقنية التحول الوراثي المباشر والبسيط (14) عند منطقة الجرح الناتج بعد فصل المجموع الخضري المتضمن للأوراق الفلقية عن المجموع الجذري عند منطقة ارتباطه بالساق،ثم نقل المجموع الخضري والمجموع الجذري كل على حدة ، الى اطباق زجاجية تحتوي على وسط MSM/2 الصلب (14)، بمعدل (5 بادرة/طبق) المدعم بالتراكيز الآتية 500 mg/L (Cef) ، 100 mg/L (Kan) ، mg/L LPS 6 ،وحسب التداخلات الآتية Cef+Kan و Cef+LPS و Kan+LPS و Cef+Kan+LPS غلقت الاطباق بالبارافلم ووضعت بشكل مائل في حاضنة النمو عند درجة حرارة (25±2°م) وفي ظروف نظام الإضاءة والظلام التعاقبي (16 ساعة ضوء/ 8 ساعات ظلام)مع شدة إضاءة 2000 لوكس.

تجذير المجموع الخضري الجديد

تم فصل المجموع الخضري المتكون حديثا على بادرات النفل التي سبق ان قطع مجموعها الخضري (الفقرة أعلاه) ثم غرس بشكل عمودي في دوارق زجاجية حجم (250 مل) تحتوي على 50مل من وسط MSO (15)بمعدل (2 مجموع خضري/دورق). فضلا عن استخدم المجموع الخضري الناتج من إنبات بذور النفل غير الملقحة بالبكتريا بعد إزالة مجموعها الجذري كعينة مقارنة. وضعت جميع الدوارق في حاضنة النمو عند الظروف المذكورة في أعلاه .

تقدير المحتوى البروتيني

قدر المحتوى البروتيني لبادرات نباتات النفل الأبيض المقطوعة المجموع الخضري أو المجموع الجذري الملقحة وغير الملقحة ببكتريا *A. rhizogenes* بالاعتماد على طريقة بايوريت Birut method باستخدام العدة (Kit) المنتج من شركة (Randox Laboratories Ltd.,Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 4QY).

النتائج

استحداث ألمجاميع ألخضرية أو ألجذرية ألجديدة على بادرات النفل باستخدام الطريقة المحورة عن تقنية التحول الوراثي المباشر والبسيط

أدى إصابة المجموع الجذري الجديد عند منطقة الجرح الناتج من قطع المجموع الخضري لبادرات النفل التي بعمر (5 ايام) ببكتريا *A. rhizogenes* R1601 النامية في وسط MSM0/2 (غير المدعم)، الى تكوين مجاميع خضرية جديدة بنسبة 48% بعد 3-4 ايام من الاصابة، تميزت بتعدد قممها النامية(2-5) و بسيقانها القصيرة الناتجة من منطقة الجرح ، وبوريقاتها الصغيرة ذات الاحجام المتباينة، وبعد أسبوعين من التحضين نقلت هذة البادرات الى وسط MSM/2 المدعم بالمضاد الحيوي Kan ، حيث لوحظ نمو البكتريا بشكل كثيف على طول البادرات مع تغير لون المجموع الجذري في العديد منها إلى اللون البني مصحوبا باصفرار المجموع الخضري الجديد كما انخفض محتواها البروتيني من 15.2 و 10.5 غم/لتر في عينتي المقارنة (البادرات غير مقطوعة المجموع الخضري والنامية في وسط MSM/2 غير المدعم والمدعم بالمضاد الحيوي Kan) ، إلى 8.2 و7.4 غم/لتر، على التعاقب الجدول(1). وعند نقل هذة البادرات إلى ذات الوسط الصلب المدعم بالمضاد الحيوي Cef أو Cef مع Kan تحسن نمو البادرات بدلالة زيادة عدد أفرعه الخضرية الجديدة الى 6.4 فرع/نبات ومعدل ارتفاع مجاميعه الخضرية الجديدة إلى 43 و48 ملم ، ومحتواه البروتيني الكلي الى 16.8 و18.3 غم/لتر على التعاقب، قياسا بنموه في المعاملات السابقة أو في عينة المقارنة، كما ادى اضافة مركب عديد السكريات الدهنية (LPS) متداخلا مع المضادات الحيوية المضافة لذات الوسط الغذائي الى تحسن ايجابي في نمو النبات متمثلا بزيادة إعداد الأفرع الخضرية والمحتوى البروتيني لهذه البادرات الذي بلغ اقصاه في النباتات النامية في الوسط المدعم بـ Kan + LPS أو Cef+ Kan الى(6.8 و7.0 فرع خضري /نبات) والى (22.2 و23.8 غم/لتر) على التوالي، قياسا بالنباتات النامية في الوسط المدعم Cef+ Kan+LPS (4.4 فرع خضري/نبات و19.6 غم/لتر).

أما بادرات النفل المصابة بالبكتريا عند الجرح الناتج من قطع مجاميعها الجذرية النامية في ذات الوسط الغذائي (MSMO/2) فقد امتازت بتكوين مجاميع جذرية جديدة بلغت نسبتها 85% بعد 4-5 ايام من الاصابة التي امتازت بلونها الأبيض الناصع وكثافة شعيراتها الجذرية وقلة تفرعاتها الجانبية ، فضلا عن ضعف النمو العام للنبات عند نموه على الوسط الصلب السابق ذكره ، و بعد نقلها الى الوسط المدعم بالمضاد الحيوي Kan لوحظ كثافة نمو البكتريا على السطح الخارجي للنبات وامتداد نموها إلى سطح الوسط الغذائي ،اثر ذلك سلبا على المحتوى البروتيني الذي انخفض لغاية (8.1 و7.9 غم/لتر) قياسا بعينتي المقارنة(المجموعة الاولى) البالغة (15.2 و10.5 غم /لتر) على التعاقب الجدول (2) ، الا ان نمو النبات تحسن بشكل ملحوظ عند نمو هذه البادرات على سطح الوسط المضاف إليه المضاد الحيوي Cef أو Kan +Cef بدلالة زيادة معدلات ارتفاع مجاميعها الخضرية(51 و54 فرع خضري/نبات) وأطوال مجاميعها الجذرية 41 ، 46ومحتواها ألبروتيني (18.2 و20.2 غم/لتر) على التوالي، كما بلغ أقصى نمو للنبات في البادرات النامية على سطح الوسط المدعم بالمضادت الحيوية مع مركب LPS والتي بلغ محتواه البروتيني(20.4 و22.8 و20.0 غم /لتر) في الأوساط الغذائية المدعمة ب LPS + Kan ، Cef + LPS ، Cef + Kan+LPS على التعاقب ،قياسا بعينتي المقارنة أو بباقي المعاملات .

دلائل التحول الوراثي في بادرات النفل الأبيض

إنتاج بادرات نفل مقاومة للمضاد الحيوي Kan

أظهرت بادرات النفل المقطوعة المجموع الجذري أو المجموع الخضري المحولة وراثيا ببكتريا *A. rhizogenes* R1601 الحاملة للجينات المسئولة عن تشفير المقاومة للمضاد الحيوي Kan قابلية جيدة للنمو على سطح الوسط الغذائي الصلب MSM/2 المدعَم بهذا المضاد الحيوي بتركيز 100 غم/لتر وبالمضاد الحيويCef بتركيز 500 ملغ/لتر .

تجذير المجموع الخضري الجديد بعد استئصاله من بادرات النفل المحولة وراثيا

لم ينجح تجذير المجاميع الخضرية الجديدة الناتجة من تقنية التحول الوراثي المباشر لبادرات النفل المقطوعة المجموع الخضري والمصابة ببكتريا *A.rhizogenes* R1601 في حين تكونت مجاميع جديدة لبادرات النفل الناتجة من إنبات البذور والمقطوعة المجموع الجذري عند نموها على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو.

الجدول (1): تأثير تدعيم وسط MSM/2 الصلب بالمضادين الحيويين Kan وCef ومركب LPS، على تكوين الأفرع الخضرية والمحتوى ألبروتيني لبادرات النفل المقطوعة الأفرع الخضرية والملقحة ببكتريا *A. rhizogenes* R1601، بعد 30 يوم من التحضين .

بادرات النفل	وسط MSM/2 المدعم	معدل ارتفاع المجموع الخضري (ملم) (S.D. ±)	عدد الأفرع الخضرية/ نبات (S.D. ±)	طول المجموع الجذري (ملم) (S.D. ±)	المحتوى ألبروتيني (غم/لتر)	
					المجموع الخضري (S.D. ±)	الكلي
*المجموعة الأولى	0	41 (2.46±)	6.2 (1.98±)	68 (1.80±)	9.3 (3.36±)	15.2
	Kan	32 (1.72±)	4.4 (1.93±)	44 (1.34±)	7.0 (2.96±)	10.5
**المجموعة الثانية	0	31 (3.11±)	4.6 (2.68±)	62 (1.96±)	5.1 (0.93±)	8.2
	Kan	33 (1.63±)	3.8 (2.33±)	54 (3.11±)	4.9 (0.92±)	7.4
	Cef	43 (2.32±)	6.4 (0.64±)	60 (4.33±)	9.6 (1.11±)	16.8
	Cef+ Kan	48 (3.96±)	6.4 (1.91±)	58 (2.98±)	13.1 (1.34±)	18.3
	Cef+ LPS	48 (1.36±)	7.0 (1.88±)	56 (1.68±)	17.9 (2.16±)	23.3
	Kan+ LPS	37 (1.66±)	6.8 (2.34±)	48 (2.12±)	17.0 (3.60±)	22.2
	Kan+ Cef+ LPS	42 (1.32±)	4.4 (1.14±)	52 (0.98±)	13.8 (1.86±)	19.6

* بادرات النفل غير مقطوعة المجموع الخضري وغير الملقحة بالبكتريا (المقارنة).

** بادرات النفل المقطوعة المجموع الخضري والملقحة بالبكتريا / القيم الواردة تمثل معدل 50 مكرر/معاملة.

Kan: Kanamycin، Cef: Cefotaxime، LPS: Lipo-polysaccharide، ± S.D. الانحراف القياسي

الجدول (2): تأثير تدعيم وسط MSM/2 الصلب بالمضادين الحيويين Kan وCef ومركب LPS، على تكوين المجموع الجذري والمحتوى ألبروتيني، لبادرات النفل المقطوعة المجموع الجذري، والملقحة ببكتريا *A. rhizogenes* R1601، بعد 30 يوم من التحضين .

بادرات النفل	وسط MSM/2 المدعم	معدل ارتفاع المجموع الخضري (ملم) (S.D. ±)	عدد الأفرع الخضرية/ نبات (S.D. ±)	طول المجموع الجذري (ملم) (S.D. ±)	المحتوى ألبروتيني (غم/لتر)	
					المجموع الخضري (S.D. ±)	الكلي
*المجموعة الأولى	0	41 (2.46±)	6.2 (1.98±)	68 (1.80±)	9.3 (3.36±)	15.2
	Kan	32 (1.72±)	4.4 (1.93±)	44 (1.34±)	7.0 (2.96±)	10.5
**المجموعة الثانية	0	40 (2.36±)	4.0 (2.66±)	35 (0.98±)	5.3 (1.02±)	8.1
	Kan	37 (1.99±)	3.6 (1.56±)	33 (0.76±)	5.1 (1.33±)	7.9
	Cef	51 (3.22±)	6.4 (4.32±)	41 (1.72±)	11.8 (0.90±)	18.2
	Cef+ Kan	54 (2.33±)	6.2 (1.23±)	46 (2.66±)	15.1 (0.88±)	20.2
	Cef+ LPS	58 (1.33±)	6.8 (1.89±)	40 (1.66±)	16.8 (2.24±)	22.8
	Kan+ LPS	48 (1.64±)	4.0 (1.11±)	36 (3.12±)	16.4 (0.96±)	20.4
	Kan+ Cef+ LPS	42 (0.96±)	3.8 (1.88±)	33 (1.80±)	16.2 (1.22±)	20.0

* بادرات النفل غير مقطوعة المجموع الجذري وغير الملقحة (المقارنة).

** بادرات النفل المقطوعة المجموع الجذري والملقحة / القيم الواردة تمثل معدل 50 مكرر/معاملة.

Kan: Kanamycin، Cef: Cefotaxime، LPS: Lipo-polysaccharide، ± S.D. الانحراف القياسي.

المناقشة

استجابت بادرات النفل الأبيض لتكوين الجذور الشعرية عليها نتيجة إصابتها ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601، والتي يعزى تكوينها إلى توسط هذه البكتريا في نقل جيناتها المحمولة على البلازميد (PTVK291) المعدل وراثيا (16،17) إلى خلايا النبات وتداخله مع مادته الوراثية (18) وهي الجينات الخبيثة Virulance (vir) genes التي تسيطر على نقل قطعة Transferred-DNA (T-DNA) ، الحامل لجينات Oncogenicity (Onc) genes (19) المسئولة عن الانقسام غير الطبيعي لخلايا النبات

المصابة (20)، وجينات (root loci(*rol* genes، المسئولة عن تحويل الخلايا الطبيعية للنبات المصاب إلى جذور شعرية (21) الواقعة على قطعة T_I-DNA (6).

إن النتائج المتحققة من تطبيق التقنية البسيطة للحصول بشكل مباشر على نباتات محولة وراثيا ، باستخدام طريقة Oger وجماعته(14) أو الطريقة المحورة عنها، فقد يعزى تدهور حالة بادرات النفل عند نموها على الوسط غير المدعم أو المدعم بالمضاد الحيوي Kan، الى نمو البكتريا وخروجها على سطح البادرة في الوسط الغذائي، والتي ادى امتلاكها لصفة المقاومة لهذا المضاد، إلى عدم تثبيط نموها، وبالتالي تاثيرها المباشر على نمو البادرات ومحتواها البروتيني، باعتبارها أحد أهم المسببات المرضية للنباتات من ذوات الفلقتين (22)، نتيجة لاندماج جيناتها الواقعة على البلازميد مع المادة الوراثية للنبات، مؤديا الى سيطرة جيناتها على جميع العمليات الحيوية لعائلها، لذلك ادى قتل هذه البكتريا بالمضاد الحيوي Cef(23)، المضاف الى الوسط لوحده أو مدمجا مع Kan إلى تحسن نمو النبات نتيجة لاحتمالية انتقال صفة المقاومة للمضاد الحيوي Kan، أما زيادة المحتوى البروتيني، فقد يفسر غالبا الى استخدام بادرات النفل المصابة ببكتريا *Agrobacterium* لعديد السكريات المفرز من قبل هذه البكتريا (24) كمصدر نتروجيني لاحتواءه على مجموعة الامين الداخلة في تكوين الاحماض الامينية المكونة للبروتينات النباتية، أو بتاثير التعبير الجيني للجينات المسئولة عن التشفير لإنتاج الاحماض الامينية النادرة بعد انتقالها من بلازميد بكتريا *Agrobacterium* ، إلى المادة الوراثية لبادرات النفل المصابة، علما ان بلازميد Ri يحوي على الجينات المشفرة للحامضين الامينيين Manopine و Agropine (25) وبما ان السلالة المستخدمة في هذه الدراسة (R1601) فاقدة للحامض الاميني Agropine بدلالة ما أشار إليه الباحث Ellis وأخرون (16) ، عليه يرجح امتلاك هذه البكتريا للحامض الاميني الاخر وامكانية تشفيره من قبل جينات النبات المحولة وراثيا، وبتأثيره غير المباشر في زيادة المحتوى ألبروتيني لهذه البادرات.

لقد أدى استخدام بادرات النفل الملقحة ببكتريا *Agrobacterium* لعديد السكريات الدهنية، المعزول من بكتريا الرايزوبيا المتخصصة في إصابة بادرات النفل، والمضافة الى وسط النمو، فضلا عن إمكانية استخدام عديد السكريات الدهنية لبكتريا *Agrobacterium* كما تم توضيحه مسبقا، الى زيادة محتواها البروتيني قياسا بالمعاملات السابقة، بعد تحليلها بفعل انزيم Chitinase المفرز من قبل بادرات النفل بسبب وجود هذين المركبين كمادة اساس، الى وحدات متكررة من سكر الكلوكوز الاميني (26).

إن تقنية التحول الوراثي الموضحة في هذه الدراسة، مكنتنا من الحصول على نباتات نفل محولة وراثيا، بتكرارات عالية بسبب استخدام السلالة *A. rhizogenes* R1601

المعروفة بصفة Hypervirulence strain ، والتي تمتاز بقصر الفترة الزمنية اللازمة للحصول على نباتات محولة وراثيا (14)، قياسا بالفترة الأطول، عند استخدام تقنية الزراعة النسيجية للجذور الشعرية المحولة وراثيا (27)، أو قطع الأوراق الملقحة بهذه البكتريا (28)، فضلا عن ظهور التباينات المظهرية بنسب اكبر من الملاحظة في النباتات الناتجة عن مزرعة الجذور الشعرية والتي تعزى غالبا، الى الانتقال الفعلي لقطعة T-DNA من البكتريا الى المادة الوراثية للنباتات المصابة (29)، كما في إنتاج الازهار غير الطبيعية، التي أشار إليها أيضا باحثون عديدون منهم (20)، أو إنتاج نباتات غير طبيعية مقاومة للمضاد الحيوي Kan وذلك بسبب دمج قطعة T-DNA مع الناقل الثنائي (binary vector) والتعبير عنه في المادة الوراثية للنبات (30). أما تفسير الحالات التي ظهرت بنسب متباينة والمتمثلة بفشل تكوين الجذور الشعرية أو بعدم نقل صفة المقاومة للمضاد الحيوي Kan، أو عدم تغير شكل الأوراق أو الشكل العام لبادرات النفل، فقد يعود إلى التعبير الضعيف للجينات الموجودة في بلازميد بكتريا *A. rhizogenes* السلالة R1601، أوالى اختلاف حساسية هذه البادرات تجاه التأثيرات الناتجة من تشفير هذه الجينات (31).و يؤكد عدم تجذير الأفرع الخضرية الجديدة الملاحظة في هذه الدراسة، على حصول التحول الوراثي بهذه الطريقة وذلك بسبب عدم التجذير للنباتات المحولة وراثيا من الجيل الأول (32) أو التجذير بنسب واطئة جدا (14).

مع استخدامنا لهذه البكتريا، في الحصول على أفرع خضرية محولة وراثيا، إلا أن الطريقة المحورة كانت أكثر ملائمة للحصول على بادرات محولة وراثيا، وذلك بسبب تخصص هذه البكتريا في إنتاج جذور شعرية محولة وراثيا (22). قد يؤدي امتلاكها للجينات المشفرة لبعض الأحماض الامينية النادرة، الى زيادة محتواها البروتيني لاسيما في مجاميعها الخضرية التي امتازت بلونها الأخضر الزاهي وقوامها المنتصب .

المصادر

1- Eikan G.H. The taxonomy of the Rhizobiaceae. In: International review Cytology, supplemente.Vol.16, Academic press. New York (1981).

2- Long S. R. The Plant Cell, 8: 1885-1898. (1996).

3- Hirsch A.M. Plant Biol.,2:320-326 (1999).

4- Spaink, H. P. , Sheeley, D. M. , Van Brussel A. A. N., Colushka J., York W. S., Tak T., Geiger O., Kennedy E. P., Reinhold V. N. and Lugtenberg B. J. J., Nature, 354: 125-130 (1991).

5- Hirsch A. M., New Phytol., 122: 211-237(1992).

6- Petit A., Berkaloff A. and Tempe J.، Mol. Gen. Genet., 202: 388-393(1986).

7- Willmitzer L., Sanchez- Serrano J., Buschfeld E. and Schell J.، Mol. Gen. Genet., 186: 16-22(1982).

8- Dessaux Y., Petit A., Farrand S. K. and Murphy P. J." Opines and opine like molecules involved in plant-Rhizobiaceae interactions. In the Rhizobiaceae. Eds., H. P. Spaink A., Kondorosi and P. J. J. Hooykaas. (Dordrechit Kulwer Press)(1998).

9- Binns A. N. and Costantino P.، The *Agrobacterium* oncogenes. In the Rhizobiaceae. H. P. Spaink A . Kondorosi and P. J. J . Hooykaas eds . (Dordrecht: Kulwer press), (1998).

10- Morgan A. J., Cox P. N., Turner , D. A., Peel E., Davey M. R., Gartland K. M. A. and Mulligan B. J., Plant Sci., 49:37-49(1987).

11- Ervin S. E. and Hubbell D. H., Appl. Environ. Microbiol., 49: 61-68 (1985).

12-Vincent J. M., A Manul For The Practical Study of Root Nodule Bactria. IBP Handbook No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 113-131(1970).

13- Fahraeus G., J. Gen. Microbiol., 16: 374-381(1957).

14-Oger P., Petit A. and Dessaux Y. , Plant Science, 116: 159-168(1996).

15- Murashige T. and Skooge F.، Physiol. Plant. 15: 473-497(1962).

16- Ellis D., Roberts D., Satton B., Lazaroff W., Webb D. and Flinn B. , Plant Cell Reports, 8: 16-20 (1989).

17- Chilton M., Tepfer D. A. , Petit A., David C, Cass-Delbart F. and Tempe J.، Nature, 195: 432-434 (1982).

18- Bevan M. W. and Chilton M. D. , Ann. Rev. Genet., 16: 357-384 (1982).

19- Binns A. N. and Costantino P. ,The *Agrobacterium* oncogenes. In the Rhizobiaceae. H. P. Spaink A . Kondorosi and P. J. J . Hooykaas eds . (Dordrecht: Kulwer press) (1998).
20-Binns A. N. and Thomasshow M. F. , Ann. Rev. Microbiol., 42: 575-606 (1988).
21- Schmulling T., Schell J. and Spena A.، EMBO. J., 7: 2621-2629. (1988).
22- Costantino P., Spano L., Pomponi M. and Ancord G. , J. Mol. Appl. Genet. 2: 465-470 (1984).
23- Stougaard J. , *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants in : Methods in molecular Biology, Vol. 49: Plant gene transfer and expression protocols (Eds) by: H. Jones Humana Press Inc. Totawa, Nj, (1999).
24- Whatley M. H., Bowdin J. S., Lippincott B. B. and J. A. Lippincott. , Infect Immun. 13: 1080-1083(1976).
25- Hooykaas P. J. J. , Plant Molecular Biology, 13: 227-336 (1989).
26- John M., Rohrig H., Schmidt J., Walden R. and Schell J. , Trends in Plant Science, 2:111-115 (1997).
27- Petit A., Stougaard J., Kuhle A., Marcker K. A. and Tempe J. , Mol. Gen. Genet., 207: 245-250 (1987).
28- Bryant J. A. , Plant Today, Jan. - Fab., : 23-28 (1988).
29- Sinkar V. P., Pythoud F., White F. F. and Nester E. W., Gordon, Genes and development (1988). (C. F. Manners and Way, 1989).
30- Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J. and Schilperoort R. A. , Nature, 303: 179-180 (1983).
31- Manners J. M. and Way H. , Plant Cell Reports, 8: 341-345 (1989).
32- Chupeau M. C., Bellini C., Guerrhe P., Maisonneuve B., Vastra G. and Chupeau Y. , Biotechnology, 17: 503-508 (1989).