التعبير المظهري على الأجزاء النباتية المفصولة من نبات عين البزون *Catharanthus roseous* الناتج من التلقيح بعزلات من بكتيريا *Agrobacterium sp.* المعزولة محليا

Phenotypic Expression in *Catharanthus roseus* Explants Inoculated with *Agrobacterium* Strains Locally Isolated

صباح مهدي هادي
المختبر البيئي المركزي/ جامعة بغداد
Sabah Mehdi Hadi
Central Environmental Laboratory/ Baghdad University

E-mail: sabahtech2013@gmail.com

الملخص

عزلت بكتيريا تابعة للجنس *Agrobacterium sp.* من التربة المحلية في الجادرية, بغداد-العراق وتم تشخيصها باستخدام الاوساط الانتقائية والفحوصات الكيموحيوية, تم الحصول على 21 عزلة معظمها كانت تابعة للنوع *Agrobacterium rhizogens*. اظهرت جميع العزلات قدرتها على انتاج الكاتاليزوالاوكسديزوغاز H_2S والنمو في الوسط الملحي 2% كلوريد الصوديوم, معظم العزلات كانت تابعة للنمط الحيوي 2 وذلك لتمكنها من النمو في الوسط الزرعي New and Kerr. اختبرت القدرة الآمراضية للبكتيريا بوساطة تقنية زراعة الآنسجة النباتية وباستخدام اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseous* وزراعتها في الوسط الزرعي B5 والحاوي على 30 ملغم /لتر سكروز والخالي من منظمات النمو. أظهرت عزلات النوع *A.rhizogens* قدرتها على أحداث مرض التجذر الشعري في الأوراق اما النوع *A. tumefaciens* فأظهر قدرته على احداث مرض التورم التاجي بعد اصابتها بالبكتيريا.

كلمات مفتاحية: *Agrobacterium sp.*, عين البزون, زراعة انسجة نباتية, التعبير المظهري

Abstract

***Agrobacterium* species were isolated from local soil in Jadirrya, Baghdad, Iraq, twenty one strains were isolated, most of them were identified as *Agrobacterium rhizogen* . All the isolated strains show the ability to production catalase, peroxidase and H_2S, salt tolerance for NaCl (2%). Most isolated strains were confirmed as biovair 2 because they can grow on New and Kerr medium. The pathogenicity of these bacteria was tested using leaf explants of *Catharanthus roseus* cultured in B5 medium supplemented with 30 g\l sucrose and hormone free. *Agrobacterium rhizogens* showed the ability to induce and form hairy roots on the explants while the *Agrobacterium tumefaciens* showed the ability to induce crown gall tumors after inoculation with the bacterial spp.**

Key words: *Agrobacterium, Catharanthus roseus*, plant tissue culture, phenotypic expression.

المقدمة

يشتمل الجنس *Agrobacterium* على بكتيريا تعيش بصورة طبيعية في التربة, سالبة لصبغة كرام ولها القابلية على إصابة النباتات من أماكن الجروح وخاصة النباتات ذوات الفلقتين [2,1], تحدث الإصابة بمرض التورم التاجي Crown gall لوجود النوع *A. tumefaciens* والمسبب لتكوين الأورام في النبات ومرض التجذر الشعري Hairy roots لوجود النوع *A. rhizogens* والمسبب لتكوين الشعيرات الجذرية في النبات [3,2], قد تحدث الاصابة بمرض التورم التاجي لبعض نباتات ذوات الفلقة الواحدة [5,4]. إن استجابة النبات للنمو وحدوث المرض بعد الاصابة بالبكتيريا يحدث بفعل الهندسة الوراثية وكنتيجة لوجود الميغابلازميد في البكتيريا, أن وجود بلازميدات Ri وTi وهي بلازميدات كبيرة الحجم تصل إلى (200-250) كيلوبيز مسببة الأمراضية لوجود منطقة (T – DNA) الموجودة فيها والتي تتحد مع جينوم النبات المصاب أو المضيف وتؤدي إلى تغير في عملياته الآيضية إذ يقوم النبات بتصنيع الهرمونات Phytohormones والتي تبرز الصفات المظهرية للاصابة المرضية بعد تطور النسيج المنقول. تحث البكتيريا نمو النسيج الورمي أو الشعيرات الجذرية بشكل متفرد عند زراعة الأنسجة النباتية في الوسط ألزرعي الخالي من الآوكسينات والسايتوكاينينات وهذا يعود لوجود منطقة (T – DNA) التي تشفر جيناتها لأنزيمات خاصة لإنتاج وإفراز الاوبينات Opines [8,7,6,2] وهي أحماض امينية مشتقة من الحامض الاميني Arginine مثل agropine, mannopine, agricnopine, octopine, nopaline . كما إن صفة الضراوة في البكتيريا والتي تعود لوجود بلازميدي Ri,Ti تتحدد بنوع الآوبينات التي يتم إنتاجها[9,6,3].

إن استخدام زراعة الأنسجة النباتية في إنتاج مركبات الآيض الثانوي يواجه مشاكل عدة منها تطبيقات أنتاج المركبات القلويدية من نبات عين البزون الذي ينتج كميات كبيرة من القلويدات الآندولية مثل Ajmalicine والمزدوجة الصيغة الجزيئية Vinblastine,Vincristine والتي تعتبر مكلفة تجاريا [12,11,10], إن صعوبة إنتاج القلويدات من خط خلايا نبات عين البزون غير المتخصصة وغير المنظمة والتي تكون إنتاجيتها للقلويدات ضئيلة أو معدومة حث الباحثين إلى تطوير زراعة الجذور المنقولة والمتخصصة والتي تظهر بوجود بكتيريا *A . rhizogens* والتي ممكن آن تحقق إنتاجية أفضل للقلويدات] 14,13,11] . تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص بكتيريا*Agrobacterium* بنوعيها *A . rhizogens* و *A. tumefaciens* من بعض الترب المحلية ونميت

على بعض الأوساط الأنتقائية واجريت عليها الفحوصات البكتريولوجية والكيموحيوية, كما استعملت تقنية زراعة الأنسجة النباتية على نبات عين البزون للكشف عن القدرة الآمراضية للبكتيريا pathogenicity.

المواد وطرق العمل

جمعت ثلاث عينات من المنطقة القريبة لسطح التربة من لنباتات عين البزون والدفلة والياس في جامعة بغداد/ الجادرية (جامعة بغداد) في شهر تشرين الأول لسنة 2006 بواقع 4 مكررات لكل عينة, زرعت العينات بإضافة1 غم من التربة الى 100 مل من وسط NBYS المكون من (4 غم /لتر كلوكوز,5 غم /لتر مستخلص الخميرة و8غم/لتر المرق المغذي) عدل الآس الهيدروجيني للوسط الى 7.0 وعقم ثم أضيفت اليه المضادات الحيوية وهي (البنسلين جي 100 ملغم/لتر,الستربتومايسين سلفيت 30 ملغم /لتر,السيكلوهكساميد 250 ملغم/لتر), حضنت العينات بالحاضنة الهزازة على درجة 28م وسرعة 120 دورة/دقيقة ولمدة 48 ساعة. نميت البكتيريا على الأوساط الانتقائية Schroth وNew and Kerr [15] باضافة 0.1 مل من مزروع البكتيريا في وسط NBYS الى الآطباق الزرعية الحاوية على الأوساط الأنتقائية ونشرها باستعمال ناشر زجاجي, حضنت الأطباق على درجة 28°م ولمدة 48 ساعة, انتقيت المستعمرات النامية ونميت على وسطي AB كلوكوز و YMB الصلب [17,16]. أجري الفحص المظهري للمستعمرات مثل اللون والشكل والفحوصات الكيموحيوية كفحص الأندول, انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين, فحص الأوكسديز, فحص الكاتاليز, النمو في وسط ملحي لكلوريد الصوديوم NaCl 2 %, صبغة كرام والنمو في درجات حرارة مختلفة [18]. زرعت العزلات بعد تنقيتها على وسط الحفظ المائل YMA اذ يمكن ان تبقى لفترة شهرين في درجة 4م. كشف عن القدرة الامراضية للبكتيريا pathogencity بتقنية زراعة الأنسجة النباتية وباستخدام نبات عين البزون. فصلت الأوراق القمية للنبات عقمت وقطعت استعدادا لزراعتها في الوسط الزرعي B5 الحاوي على30 ملغم/لترسكروزوالخالي من منظمات النمو [19], خدشت سطوح الأجزاء النباتية المعقمة والمقطعة ولقحت ببضع قطرات 5- 10مايكروليتر براسب مزروع البكتيريا المنمى في المرق المغذي (14 غم/لتر) لمدة 24 - 48 ساعة بعد ترسيبه بجهاز الطرد المركزي لمدة 10دقائق وسرعة 4000 دورة/دقيقة. حضنت الأطباق في الحاضنة على درجة 28م ولمدة24 - 48 ساعة, أوقف نمو البكتيريا بنقل الآجزاء النباتية الملقحة الى أطباق حاوية على الوسط الزرعي B5 والحاوي على30 ملغم/لترسكروزوالخالي من منظمات االنمو وبوجود المضادات الحيوية (البنسلين 1 غم/لترأو سيفاتوكسام 1 غم/لتر) حضنت الاطباق في الحاضنة على درجة 28م ولمدة 24 - 48 ساعة, بعدها نقلت الآجزاء النباتية الى الوسط الزرعي السائل B5 الحاوي على30 ملغم/لتر سكروز والخالي من منظمات االنمو وحضنت بالحاضنة الهزازة على درجة 28م وسرعة 40 دورة/دقيقة في الظلام [21,20].

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 21 عزلة محلية للبكتيريا التابعة للجنس *Agrobacterium*, اشارت الفحوصات البكتريولوجية للبكتيريا عند تنميتها على الاوساط الانتخابية (Schroth 1965) و (New and Kerr 1970) [15] بتكوينها لمستعمرات بيضاء بنية فاتحة اوبيضاء – رصاصية اللون محدبة الشكل ذات حافات ملساء, مخاطية لامعة وغير شفافة وتبدو العزلات تحت المجهر متجمعة بأشكال نجمية أو زهرية [18]. درست بعض الصفات التشخيصية للعزلات عن طريق اجراء بعض الفحوصات الكيموحيوية مثل فحص الاندول وانتاج غاز H_2S وفحص الاوكسديز والكاتاليز والنمو في درجات الحرارة المختلفة والقدرة على النمو في الوسط الملحي واستعمال المصادر الكاربونية المختلفة جدول (1) يبين نتائج الاختبارات للبكتيريا المعزولة من التربة المحلية.

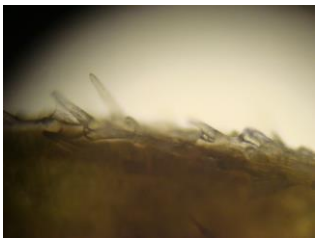
جدول (1): الفحوصات البايوكيميائية لعزلات بكتيريا *Agrobacterium*

رقم العزلة	النمو في الوسط Sc.	النمو في الوسط N.K	فحص الآندول	فحص الكاتاليز	فحص الآوكسديز	انتاج غاز H_2S	2% كلوريد الصوديوم	النمو على درجة 28°م	النمو بدرجة 35 °م	تكوين الجذور الشعرية	تكوين الورم التاجي
1	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
2	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+
3	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
4	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
5	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
6	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+
7	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
8	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
9	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+
10	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
11	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
12	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+
13	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+
14	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
15	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
16	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+
17	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+
18	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
19	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
20	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
21	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+

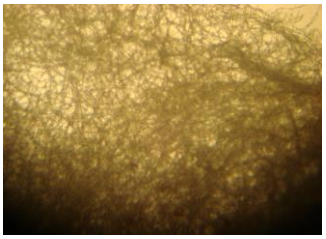
لوحظ نمو معظم العزلات في الوسط الزرعيNew and Kerr والذي يعد وسطا انتقائيا خاصا لانتخاب بكتيريا *Agrobacterium* من النمط الحيوي 2 وذلك لقدرتها على استهلاك سكر meso-erythrytol الموجود في الوسط كمصدر كاربوني كما تمكنت بعض

العزلات من النمو في وسط Schroth المعد لانتخاب البكتيريا من النمط الحيوي 1 اذ يتمكن هذا النمط من النمو على الوسط المعدني واستهلاك املاح النترات والامونيوم الموجودة فيه كمصدر نايتروجيني [18,15].
اظهرت نتائج فحص الامراضية للعزلات البكتيرية من الآجزاء النباتية المزروعة و المفصولة من اوراق نبات عين البزون بعد تلقيح الاجزاء النباتية explants للاوراق بمزروع العزلات البكتيرية قدرة بعض العزلات مثل العزلة رقم (1, 3, 4 , 5, 11)على حث الاجزاء النباتية المزروعة لتكوين الشعيرات الجذرية من مناطق القطع والخدش ونصل الورقة وحافاتها وكما مبين بالشكل (2,1) ثم تطور هذه الشعيرات الجذرية وكما مبين في شكل (3) اما العزلات رقم (13, 17, 19, 21) فأظهرت قدرتها على حث الاجزاء النباتية المزروعة على تكوين نسيج الكالس Callus من مناطق القطع والخدش وكما مبين في شكل (4).

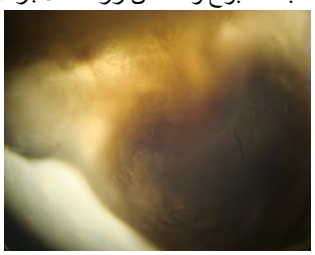
(ب) (أ)
شكل (1): (أ) نمو الشعيرات الجذرية من حافة الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون تحت المجهر(10x).
(ب) نمو الشعيرات الجذرية من نصل الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون تحت المجهر(10x) وبعد 4-6 أيام من التلقيح.

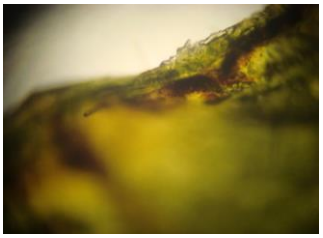


(ب) (أ)
شكل(2): (أ) نمو الشعيرات الجذرية من اماكن الخدش على الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون تحت المجهر(10x).
(ب) نمو الشعيرات الجذرية من اماكن القطع للجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون تحت المجهر(10x) وبعد 4-6 أيام من التلقيح



(ب) (أ)
شكل (3): (أ) تطور الشعيرات الجذرية من الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون بعد تنميته في الوسط الزرعي السائل B5 الحاوي على 30 ملغم/لترسكروزوالخالي من منظمات النمو وبعد6- 8 أسابيع من التلقيح.
(ب) مقطع نسيجي تحت المجهر(10x) للشعيرات الجذرية النامية من الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون.

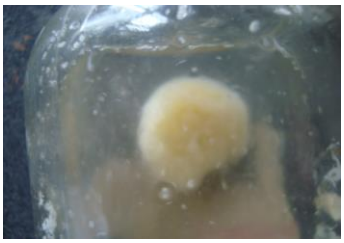




وذلك بعد اسبوع واحد من زراعة الاجزاء النباتية في الوسط الزرعي وتلقيحها بالمزروع البكتيري

(ب) (أ)
شكل(4): (أ) تكون الكالس في أماكن الخدش داخل الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون تحت المجهر(10x).
(ب) تكون الكالس من حافة الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون تحت المجهر(10x) وبعد 4-6 أيام من التلقيح.

اما شكل (5) فيمثل مراحل تطور الكالس من الجزء النباتي للورقة وهذا يدل على انتقال البلازميد من البكتيريا الى الجزء النباتي واتحاد منطقة (T-DNA) مع جينوم النبات والتي ادت الى تغير العمليات الايضية للنبات وحثه على تصنيع الهرمونات والتي طورت الجزء النباتي المزروع وابرزت الصفات المظهرية للاصابة المرضية لكل بلازميد [5,1] .



(أ) (ب)

شكل (5): (أ) تكون الكالس من الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون بعد تنميته في الوسط الزرعي السائلB5 الحاوي على 30 ملغم/لترسكروز.
(ب) تطور الكالس من الجزء النباتي للورقة لنبات عين البزون بعد تنميته في الوسط الزرعي السائلB5 الحاوي على30 ملغم/لترسكروزوبعد6- 8 أسابيع من التلقيح.

لوحظ وجود بعض العزلات البكتيرية التي أحدثت الآصابة في الجزء النباتي مثل العزلات رقم (20,18,2) ولكن لم تظهر الصفات المظهرية للآصابة المرضية كتكون الكالس أو أستطالة الشعيرات الجذرية من الجزء النباتي بشكل واضح وهذا يعود الى وجود صفة الضراوة للبلازميد والتي تتحدد بنوع الجين المحمول عليه والذي يقع في منطقة (T – DNA) والذي يشفر لنوع معين من الآوبينات التي يقوم النبات بتكوينها وافرازها لتساعده على ابراز الصفة المظهرية للمرض [22,6] أويعزى سبب عدم وجود أي استجابة للنبات ان منطقة (T – DNA) المنتقلة من البلازميد الى النبات تكون خالية من أي جينات تشفر لتكوين وافراز الاوبينات وربما تتعرض الجينات المشفرة لتصنيع الاوبينات الى عملية المثلنة methylation عند اندماجها بالجينوم النباتي وبالتالي لم يظهر أي تعبير فعال للجينات ولاتتمكن الخلية النباتية من تصنيع الاوبينات [24,23].
نستنتج من الدراسه على قدرة بكتيريا *Agrobacterium* المعزولة من التربة المحلية على حث الاجزاء النباتية المزروعة لتكوين نسيج الكالس والشعيرات الجذرية باستخدام زراعة الانسجة النباتية.

المصادر

1. Canche, B. C. and Loyola-Vargas, V. M. (1999). Chemicals from roots, hairy roots and their applications In: Chemicals Via Higher plant Biotechnology. Shahidi, M. (ed). Kluwer Academic plenum publishers, New York. pp: 235-275.
2. Islam, M. S., Akter, M. M., Rahman, M. K. and Rahman, M. M. (2010). Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall sample of dicot plants in Bangladesh. Current Res. in Biotech. 3(1): 27-36.
3. Brillanceau, M. H. David, C. and Tempe, J. (1989). Genetic Transformation of *Catharanthus roseus* G. Don bu *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports. 8: 63-66.
4. Sita, G. L. and Vally, K. (2003). Development of Transgenic Plants as Source of Edible Vaccines a new approach. In: Plant Genetic Engineering. Vol 1, Singh, R. P. Jaiwal, P. K. (eds). pp:280-315.
5. Davoodi, A. and Hajivand, S. (2013). Isolation of *Agrobacterium Tumefaciens* Strains from Crown Gall Disease on Imported Roses Plants in Crown Gall Disease on Imported Roses Plants in Qazvin Province. J. of Ornamental and Horticultural Plants. 3(2): 117-124.
6. Petit, A. David, C. Dahi, G. A. and Ellis, J. G. (1983). Further extension of the opine concept plasmids in *Agrbacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. Mol. Gen. Genet. 190: 204-214.
7. Bensaddek, L., Villarreal, M. L., Fliniaux, M. (2008). Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Electronic Journal of Integrative Biosciences 3(1):2-9.
8. Kajala, K., Coil, D. A. and Brady, S. M. (2014). Draft genome sequence of *Rhizobium rhizogenes* strain ATCC 15834. Genome Announcements. 2(5): 1-2.
9. Bivadi, V., Zakaria, R. A., Zare, N. and Yazdan, B. (2014). Effects of different tissue culture conditions in hairy roots induction in Hypericum perforatum L. International Research Journal of Applied and Basic Sciences. 8(5): 597-604.
10. David, C. and Tempe, J. (1993) Transfomation in *Catharanthus roseus* species In: Biotechnology in Agriculture and Forsty. Vlo.22 , Bajaj Y. P. S. (ed). Springer- Verlag , Berlin Heidelberig. pp: 144-156.
11. Zargar, M., Farahani, F. and Nabani, T. (2010). Hairy roots production of transgenic *Catharanthus roseus* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* under *in vitro* conditions. J. of Medicinal Plants Research. 4(21): 2199-2203.
12. Bae, H., Kim, Y. B.; Park, N., Kim, H. H. and Kim, Y. S. (2012). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation of radish (*Raphanus sativus* L. cv. Valentine) for accumulation of anthocyanin. Plant Omics Journal. 5(4): 381-385.
13. Parr, A. J. Peerless, A. C. J. and Hamill, J.D. (1988). Alkaloid production by transformed root culture of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports. **7** : 309-312.

14. Loyola, V. M. and Miranda –Ham, M. D. (1995). Root culture as a source of secondary metabolites of economic importance. In: Phytochemistry of Medicinal Plants. Johan, T. A. (ed). Planum Press, NewYork, pp: 217-248.

15. Kersters, K. and Deley, J. (2002). Genus *Agrobacterium* In: Bergys Manual of Systematic Bacteriology .Vol.1 9 th. Krieg, N. R. (ed). Williams and Wilkins, Baltimor. pp: 244-254.

16. Ciau-Uitz, R. and Miranda, J. (1994). Indole alkaloids production by transformed and non transformed root culture of *Catharanthus roseus*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30: 84-88.

17. Pandey, R., Krishnasamy, V., Kumaravadivel, N. and Rajamani,K. (2014). Establishment of hiry root culture and production of secondary metabolites in coleus (Coleus forskohlii). J. of Medicinal Plants Research. 8(1): 58-62.

18. Young, J. M., Kerr, A. and Sawada, H. (2005). Genus *Agrobacterium* " In Bergys Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2 part c Don, J. B.; Noel, R. K. and James, T. S. Springer, Baltimor. Pp: 340-346.

19. Liu, D., Ren, W., Cui, L., Zhang, L., Sun, X. and Targ, K. (2010). Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2. African Journal of Biotechnology. 10(17): 3260-3268.

20. Constabel, F. and Shyluk, J. P. (1994). Initiation, nutrition and maintenance of plant cell and tissue cultures. In: Plant Cell and Tissue Culture. Indra, K. V. and Trevor, A. T. (eds). Kkluwer Academic Publishers, Dordrecht Netherlands. pp: 3-15.

21. Komarovska, H., Giovannini, A., Kosuth, J., and Cellarova, E. (2009). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Hypericum tomentosum* L. and *Hypericum tetrapterum* fries. Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung, Tubingen. 64: 864 – 868.

22. Sharifi, S., Sattari, T. N. and Zebarjadi, A. (2014). The influence of Agrobacterium rhizogenes on induction of hairy roots and ß-carboline alkaloids production in Tribulus terrestris L. Physiol. Mol. Biol. Plants. 20(1): 69-80.

23. Dessaux, Y. and Petit, A. (1994). Opines as screenable markers for plant transformation. Plant Molecular Biology Manual. C3:1-12.

24. Dipasree, R., Majumder, A. and Jha, S. (2013). Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges. In: Biotechnology for Medicinal Plants, Shandra, S., Lata, H. and Varma, A. (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp: 29-68.