الزراعة المرافقة لخلايا المعلقات الخلوية المشتقة من كالس أوراق القرنفل *Dianthus caryophyllus* مع بلازميدات Ti

قتيبة شعيب النعمة

قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٢٠ / ١٠ /٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ٢٢ / ٤ / ٢٠٠٩)

الملخص:

عزلت بلازميدات Ti (Tumor inducing plasmids) المحفزة لتكوين الأورام من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* Binn A6. أنشئت مزارع المعلقات الخلوية من كالس أوراق القرنفل في وسط MS السائل الحاوي على 0.5 ملغم / لتر 2,4-D و 0.1 ملغم / لتر BA. انتخبت أفضل كثافتين من مزرعة المعلق الخلوي (٣٨٣ × ١٠^{٣} و 420 × ١٠^{٣} خلية / مل) ومزجت كل كثافة من مزرعة المعلقات مع التراكيز (٢٠ و ٥٠ و ٧٠ مايكروليتر) من بلازميد Ti ، ثم زرع المزيج بطريقة قطرات الاكار المتعددة. بينت النتائج أن مزج المعلقات الخلوية مع بلازميدات Ti شجع الانقسامات المبكرة لهذه الخلايا عند طمرها في قطرات الاكار المتعددة. وترتب عنها زيادة في أعداد بادئات الكالس المتكونة. وتوفر هذه التقانة المتبعة مسارا جديدا للتحولات الوراثية في النباتات باستخدام البلازميدات كناقل في هذه المهمة.

المقدمة:

تستخدم بكتريا الاكروبكتيريوم *Agrobacterium* ناقلا في برامج التحول الوراثي للنباتات وتعد من انجح الطرائق المباشرة المتبعة في الوقت الحالي. وتنفذ هذه التقنية أحيانا من خلال التلقيح في مواقع مختلفة من النبات أو أعضائه المستأصلة بالحقن المباشر بهذه البكتريا كما في تلقيح أوراق نباتات البنجر السكري ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* (الملاح والنعمة، ٢٠٠١)، أو باستعمال الزراعة المرافقة Co-cultivation مع بلازميداتها كما في نبات فستق الحقل*Arachis hypogea* (Sharma and Anjaiah, 2000). ونجحت إحدى الدراسات في الحصول على بروتوبلاست التبغ المحول وراثيا عن طريق تحضينه مع بلازميدات Ti (Tumor-inducing plasmids) بوجود ١٣,٣% من محلول PEG (Krens, *et al*., 1982). وذكرت دراسة أخرى نجاح بكتريا الاكروبكتيريوم أو بلازميداتها في احداث التحول الوراثي لنباتات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* باستخدام مزارع المعلقات الخلوية لهذا النبات (Zhang, *et al*., 1997) وفول الصويا *Glycin max*(زيدان واخرون، ٢٠٠٦).

تهدف الدراسة الحالية التعرف على تأثير مزج خلايا المعلقات الخلوية لكالس أوراق القرنفل مع تراكيز من بلازميدات Ti المعزولة من بكتريا *A. tumefaciens* في الانقسامات الخلوية وتكوين المستعمرات وتطورها إلى بادئات الكالس في قطرات الاكار المتعددة.

مواد وطرائق العمل:

إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس أوراق القرنفل:

استحدث الكالس من أوراق القرنفل باستخدام أملاح وسط MS الصلب وسطا أساسيا مدعما بإضافة ٠,٥ ملغم/لتر 2,4-D و ٠,١ ملغم/لتر BA (Yantcheva, et al., 1998)، وحضنت العينات النباتية في غرفة النزرع في نظام الإضاءة المتعاقب (١٦ ساعة ضوء/ ٨ساعات ظلام) تحت شدة إضاءة ١٥٠٠ لوكس وبدرجة حرارة ٢٥ ± ٢ درجة سيليزية.

نقل غرام واحد من الكالس الهش الفتي إلى وسط الاستحداث بحالته السائلة، وحفظت العينات في الحاضنة الهزازة (New Brunswick USA) بظروف ظلام تام عند درجة حرارة ٢٨ ± ١ درجة سيليزية وبسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٤ ساعة (Morris and Flower, 1981). رشحت المزارع المتكونة باستخدام منخل معقم دقيق حجم فتحاته ٤٦ مايكروميتر (Plant Genetic Manipulation Group. Nott. Univ. U.K.) للحصول على الخلايا المفردة وإزالة التجمعات الخلوية الكبيرة ثم أكمل حجم المزرعة إلى ٥٠ مل بإضافة كمية من الوسط السابق. أعيدت المزارع إلى الحاضنة الهزازة في ظروف التحضين نفسها لمتابعة انقسام الخلايا. وحددت كثافتها بأخذ ٠,١ مل من المعلق الخلوي بأعمار مختلفة (١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ ، ٦ ، ٧ يوم) باستخدام الهيموسايتوميتر (الملاح و زيدان، ٢٠٠٤). اديمت المزارع دوريا برفع العينات من الحاضنة وتركها بوضع جانبي داخل كابينة الزرع لمدة ٤ ساعات لاستقراها (Gresshoff, 1980). بعدئذ سكب الوسط بعناية وأضيف إلى الخلايا المترسبة ٥٠ مل من نفس الوسط (Dixon, 1985). وقدرت حيوية خلايا المعلقات باستخدام صبغة الايفان الزرقاء Evan blue (BDH chemical Ltd. Poole, England) بإتباع الطريقة القياسية (Kanai and Edward, 1973).

عزل بلازميدات Ti من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*:

استخدمت السلالة Binn A6 من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* النامية على وسط المرق المغذي Nutrient broth (Hooykaas, *et al.*, 1979) ، ثم عزلت منها بلازميدات Ti باستخدام الطريقة المعتمدة في عزلها (Brinboim and Doly, 1979).

زراعة المعلقات الخلوية في قطرات الاكار المتعددة:

انتخبت كثافة اليوم الرابع والخامس البالغة (383 × ١٠^{٣} و 420 × ١٠^{٣} خلية/مل) على التوالي. مزج ملليتر واحد من مزرعة المعلق الخلوي لكل كثافة على حدة مع ملليتر واحد من محلول ٣% من الاكار السائل المعقم المحفوظ بدرجة ٤٠ درجة سيليزية بصورة سريعة تجنبا لتصلب الاكار. وزع المزيج بهيئة قطرات متساوية الحجم في قعر أطباق بتري بلاستيكية قطرها ٩ سم(Sterilin, UK) بحدود ٨ – ١٢ قطرة / طبق، تركت الأطباق داخل كابينة الزرع لحين تصلب القطرات ثم أضيف إلى كل طبق ملليترين من الوسط السائل نفسه المستخدم لإنشاء المعلقات الخلوية (Dixon,

1985)، سدت الأطباق بالبارافلم وحفظت العينات في ظروف ٢٥ ± ٢ درجة سيليزية / ٧٠٠–٨٠٠ لوكس / ١٦ ساعة ضوء داخل غرفة الزرع. تمت متابعة العينات بصورة دورية بفحصها تحت المجهر الضوئي لتحديد بدء الانقسام الأول ومتابعة الانقسامات لتكوين المستعمرات وتطورها إلى بادئات الكالس.

الزراعة المرافقة لخلايا المعلق الخلوي مع بلازميدات Ti:

اخذ ملليتر واحد من المزارع الخلوية للكثافتين 383 × ١٠ ^{٣} و 420 × ١٠ ^{٣} خلية/مل النامية في وسط MS السائل المضاف له ٠,١ ملغم/ لتر BA + ٠,٥ ملغم / لتر 2,4-D بواقع ٣ عينات لكل كثافة ومزجها مع ٢٠ و ٥٠ و ٧٠ مايكروليتر من بلازميد Ti لكل عينة، أضيف إلى المزيج ملليتر واحد من ٣% من الاكار المعقم السائل بدرجة ٤٠ درجة سيليزية ووزع المزيج بشكل قطرات متماثلة بمعدل ٨ قطرات /طبق بتري بلاستيكي و بعد تصلبها أضيف لها ٢ ملليتر من وسط الاستحداث السائل، وحفظت العينات بنفس الظروف سابقة الذكر.

الجدول (١): كثافة وحيوية خلايا مزارع المعلق الخلوي لكالس أوراق القرنفل *Dianthus caryophyllus* بأعمار مختلفة.

عمر المزرعة (يوم)	الكثافة (× ١٠ ^{٣} خلية/مل)	الحيوية (%)
٠	٠	٠
١	١٢٠	٢٥
٢	٢٠٥	٤٢
٣	٣٢٠	٥٥
٤	٣٨٣	٧٤
٥	٤٢٠	٨٨
٦	٣٧٨	٨٠
٧	٢١٠	٧٨

الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية لكالس أوراق القرنفل مع بلازميدات Ti:

النتائج والمناقشة:

استحداث مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس أوراق القرنفل:

بينت النتائج أن كالس أوراق القرنفل الهش كان ملائما لإنشاء المعلقات الخلوية في وسط MS السائل المضاف له ٠,١ ملغم/ لتر BA + ٠,٥ ملغم / لتر 2,4-D ، إذ شجع انقسام الخلايا. وأكدت العديد من الدراسات سهولة تكوين مزارع المعلقات الخلوية من الكالس الهش كما في استحداث المعلقات الخلوية من كالس نباتات الجت (DosSantos, *et al.*, 1980) وفول الصويا (النعمة، ٢٠٠٥) والمعلق الناتج من كالس سيقان القرنفل (زيدان وآخرون، ٢٠٠٧). باشرت الخلايا المزروعة بانقسامها الأول بعد مرور ٣ أيام من عمر المزرعة، وأعقبتها الانقسامات الخلوية الأخرى حتى بلغت المزرعة أعلى كثافة لها(٤٢٠ × ١٠ ^{٣} خلية/مل) في اليوم الخامس من زراعتها أعقبها ثبات أعداد الخلايا في اليومين السادس والسابع نتيجة توقف عمليات الانقسام (الجدول ١).

أشارت نتائج زراعة المعلقات الخلوية لكالس أوراق القرنفل مع بلازميدات Ti إلى عدم تلوث الوسط السائل المزروع في قطرات الاكار مما يؤكد أولا نقاوة بلازميدات Ti المستخدمة. وأن مزج خلايا المعلق الخلوي مع البلازميد شجع حصول الانقسامات المبكرة وتكوين المستعمرات الخلوية بأعداد تفوقت عن أعدادها في عينة المقارنة الخالية من أية إضافة للبلازميد (الجدول ٢). ولوحظ أن إضافة ٢٠ مايكروليتر من البلازميد أدت إلى تكوين أعداد من بادئات الكالس فاقت تلك الأعداد المتكونة من عينة المقارنة لكلا الكثافتين المنتخبتين (الشكل ١ – a و b)، وتفوقت الكثافة الثانية (٤٢٠ × ١٠ ^{٣} خلية/مل) في أعداد البادئات المتكونة والكالس الناتج عنها (الجدول ٢) عند استخدام تراكيز ٢٠ و ٥٠ مايكروليتر من البلازميد قياسا بأعدادها المتكونة عند استخدام الكثافة الأولى ٣٨٣ × ١٠ ^{٣} خلية/مل.

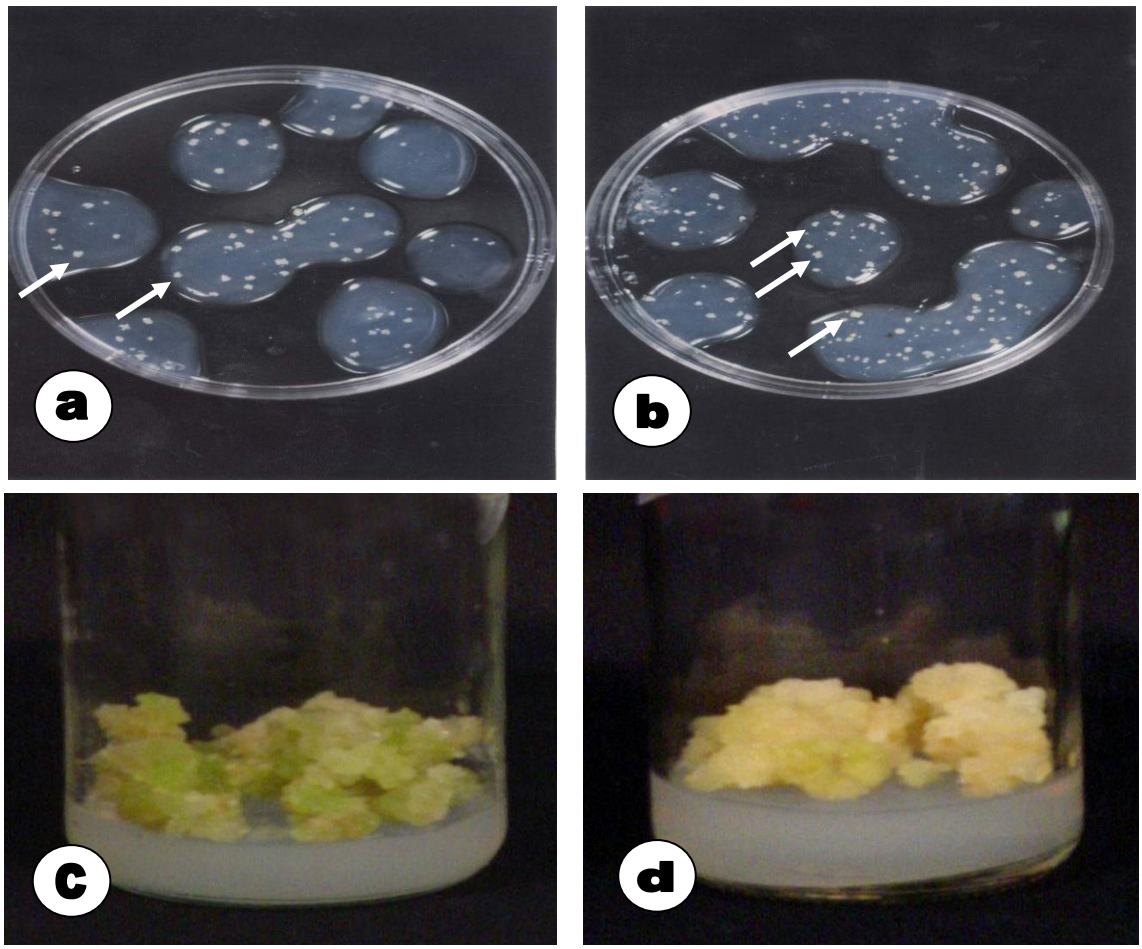
وامتاز الكالس الناتج من زراعة مزيج المعلق الخلوي مع بلازميد Ti بلونه الأبيض المصفر وقوامه الهش مقارنة مع الكالس الناتج من المعلق الخلوي لوحده المتميز بلونه الأخضر الزاهي وقوامه الهش أيضا (الشكل ١ – c و d).

الجدول (٢): تكوين بادئات الكالس من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس أوراق القرنفل مع بلازميدات Ti وزراعتها في قطرات الاكار المتعددة

المعاملات	الكثافة المزروعة ٣٨٣ × ١٠ ^٣ خلية / مل			*الكثافة المزروعة* *٤٢٠ × ١٠ ^٣ خلية / مل*	
	العدد الكلي للمستعمرات*	العدد الكلي للبادئات	عدد البادئات المكونة للكالس	العدد الكلي للمستعمرات	العدد الكلي للبادئات	عد *د البادئات المكونة للكالس*
(المقارنة) MSO	١٦٦	١٤٠	**٢٠	١٤٠	١٥٦	***٢٠
١ مل معلق خلوي + ٢٠ مايكروليتر بلازميد	٣٤٥	١٩٢	٢٥	١٧٣	٣٠٠	٤٥
١ مل معلق خلوي + ٥٠ مايكروليتر بلازميد	١٤٦	١٨١	١٨	١٢٤	٢٥٠	٣٤
١ مل معلق خلوي + ٧٠ مايكروليتر بلازميد	*١٧٠*	*٨٥*	*١٠*	*٧٨*	*٥٤*	*٥*

* القيم الواردة في الجدول ناتجة من مجموع ١٩ قطرة(مكرر)/ معاملة.

** الخطأ القياسي SE: ± 5.4 / *** الخطأ القياسي SE: ± 15.01



الشكل (١): تأثير الزراعة المرافقة لخلايا المعلقات الخلوية لكالس أوراق القرنفل مع بلازميدات Ti المعزولة من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* في تكوين الكالس بعد ٣٠ يوم من الزراعة بتقانة قطرات الاكار المتعددة

a) تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) من زراعة المعلقات الخلوية بكثافة ٤٢٠ × ١٠ ^{٣} خلية /مل لوحدها(مقارنة).

b) تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) بوجود ٢٠ مايكروليتر من بلازميد Ti مع الكثافة ٤٢٠ × ١٠ ^{٣} خلية /مل.

c) الكالس الناتج من مزرعة المعلق الخلوي لوحده بعمر اسبوعين في وسط MS الصلب المدعم بإضافة ٠,٥ ملغم/لتر 2,4-D و ٠,١ ملغم/لتر BA.

d) الكالس الناتج من مزج المعلق الخلوي مع بلازميد Ti بعمر اسبوعين في وسط MS الصلب المدعم بإضافة ٠,٥ ملغم/لتر 2,4-D و ٠,١ ملغم/لتر BA.

إن استخدام مزارع المعلقات الخلوية تمثل اتجاها حديثا في مجال التحول الحيوي للنباتات باستخدام النواقل البكتيرية، فقد أشارت العديد من الدراسات إلى استخدام بلازميدات Ri في التحول الوراثي في نباتات الباقلاء (Rech, *et al.*, 1988) والبنجر السكري (الملاح والنعمة، ٢٠٠١) كذلك استخدام بلازميدات Ti كنواقل في التحول الوراثي للخمائر كما في خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* (Paul and Hooykaas, 1996). من المحتمل أن يؤدي مزج خلايا المعلقات الخلوية مع البلازميد عاملا مشجعا لبناء منظمات النمو في هذه الخلايا (Meyer *et al.*, 2000) مما يترتب عنها زيادة المحتوى الداخلي للهورمونات فيها وهذا قد يكون دليلا للتحول الوراثي (David & Temp, 1988). إن الزيادة الحاصلة في تكوين بادئات الكالس الناتجة من مزج المعلقات الخلوية مع البلازميد قد يعزى إلى زيادة تضاعف DNA كما هو الحال عند استخدام التثقيب الكهربائي Electroporation (Rech, *et al.*, 1988)، وهذا ما أشارت له الدراسة التي مزج فيها المعلق الخلوي لنبات فول الصويا مع بلازميدات Ri (زيدان واخرون، ٢٠٠٦).

إن زيادة الانقسامات وتكوين المستعمرات الناتجة من هذه المعاملات قد يعزى إلى تأثيرات قطعة T-DNA العائدة للبلازميد واقترانها بالذخيرة الوراثية لخلايا المعلق الخلوي لنبات (Meyer, *et al.*, 2000). وان انخفاض أعداد بادئات الكالس المتكونة في حال استخدام ٧٠ مايكروليتر من بلازميدات Ti بسبب صعوبة دخولها إلى خلايا المعلق الخلوي بسبب كبر حجم هذه البلازميدات (Hooykaas & Schilperoots,1992).

إن هذا العمل قد يمثل طريقا قصيرا ومباشرا للحصول على الكالس المحول وراثيا مما يسمح بالحصول منه على النباتات المحولة وراثيا وتشجيع تمايز أنواع الكالس التي يصعب تمايزها أو زيادة محتوى الكالس من بعض النواتج الايضية. ومن المحتمل أن يكون بديلا مناسبا في مثل هذه الحالات عن استخدام تقنيات أخرى تستلزم وقتا وجهدا كبيرين بهدف الحصول على نباتات ذات صفات مرغوبة.

المصادر:

- زيدان،سهلة محمد، رشيد، جميلةهزاع والنعمة، قتيبة شعيب. (٢٠٠٦). تعريض المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا للمعاملة الكهربائية أو مزجها مع بلازميدات Ri في تكوين الكالس في قطرات الاكار المتعددة. مجلة التربية والعلم. ١٨(٣): ٨٠-٩٢.
- زيدان،سهلة محمد، رشيد، جميلةهزاع والنعمة، قتيبة شعيب. (٢٠٠٧). تكوين نباتات القرنفل في الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة. مجلة التربية والعلم. ١٩(١): ٧٦-٨٤.
- الملاح،مزاحم قاسم و زيدان، سهلة محمد. (٢٠٠٤). تقنية قطرات الاكار المتعددة في إنتاج نباتات من زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الباقلاء. مجلة التربية والعلم. ٢: ٣٥-٤٧.
- الملاح، مزاحم قاسم والنعمة، قتيبة شعيب. (٢٠٠١). تكوين الجذور الشعرية المحولة وراثيا في أوراق نباتات البنجر السكري *Beta vulgaris* بوساطة بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601. مجلة أبحاث التقانة الحيوية. ٣(٢): ٧١-٨١.
- النعمة، قتيبة شعيب. (٢٠٠٥). زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا صنف إباء *Glycine max* في قطرات الاكار المتعددة. مجلة التربية والعلم. ١٧(١):١٢٠-١٢٨.
- Brinboim, H. C. and Doly, J., (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res., 7: 1513-1523
- David, C. and Temp, J., (1988). Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Repts., 7: 88-91.
- Dixon, R. A., (1985). Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL Press, Oxford. U.K.
- DosSantos, A. V.; Oukta, D. E.; 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.
- Gresshoff,P. M., (1980). *In vitro* culture of white clover: callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. Bot. Gaz. 141: 157-164.
- Hooykaas, P. J.; Schilperoort, R. A. and Rorsch, A., (1979). *Agrobacterium* tumor inducing plasmids: potential vectors for genetic engineering of plants. Genetic Engineering: Principles & Modern. Vol. 1 ed. By J. K. Setlow and A. Hollander. NY.
- Hooykaas, P. J. J. and Schilperrort, R. A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19:15-38.
- Kanai, R. and Edwards, G. E., (1973). Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C_3, C_4 and CAM plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. Plant Physiol. 52: 84-90.
- Krens, F. A.; Molendijk, L. and Wullems, G. J., (1982). *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature. 296: 72-74.
- Meyer, A. D.; Temp, J. and Costantino, P., (2000). Hairy root: A molecular overview. Plant Microbe Inter., 5: 1-39.
- Morris, P. and Flower, M. W., (1981). A new method for the production of fine plant cell suspension culture. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 1: 15-24.
- Murashige, T. and Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Paul, B. and Hooykaas, P. J., (1996). Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 15272-15275.
- Rech, E. L.; Ochatt, S. J.; Chand, P. K.; Davey, M. R.; Mulligan, B. J. and Power, J. B., (1988). Electroporation increases DNA synthesis in cultured plant protoplast. Bio/Technol. 6: 1091-1093.
- Sharma, K. K. and Anjaiah, V., (2000). An efficient methods for the production of transgenic plants of Peanut (*Arachis hypogea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation. Plant Sci. 159: 7-19.
- Yantcheva, A.; Valhova, M. and Atanassov, A., (1998). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Cell Repts.18: 148-153.
- Zhang, J.; Li, T. and Deng,Y., (1997). Factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation of common bean. J. Am. Soc. 122: 300-305.

Co-cultivation of cell suspension derived from leaf callus of *Dianthus caryophyllus* with Ti plasmids

Q. Sh. Al-Ne'ma
Depart. Of Biology , College of Education , Univ. of Mosul , Mosul , Iraq
(Received 20 / 10 / 2008 , Accepted 22 / 4 / 2009)

Abstract:
Ti-plasmid (Tumor inducing plasmid) was isolated from *Agrobacterium tumefaciens* Binn A6. Cell suspension was established from leaves callus of *Dianthus caryophyllus* in liquid Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg / L 2,4-D and 0.1 mg / L BA. The favorite density were (383 × 10^3 and 420 × 10^3 cell / ml). They mixed with certain volum of Ti-plasmid (20, 50 and 70 µL), the mixture cultured by multiple drops of agar. The results indicate that mixing Ti-plasmid with cell suspension enhanced the formation of cellular colonies, and were found to increase the number of callus primordia formed.