------مجلة علوم الرافدين، المجلد 27، العدد 1، ص 266-276، 2018------

الكشف عن جينات *rol* B و *rol* C في انسجة الكالس المشتق من تحضين المعلقات الخلوية للجزر (*Daucus carota* L.) مع pRi

مزاحم قاسم الملاح**
قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة الموصل
****Email: mozahim_kasim52@yahoo.com**

أمجد عبد الهادي محمد*
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل
***Email: biology19802007@yahoo.com**

(أُستلم 31/ 3 /2014 ؛ قُبل 26 /5 /2014)

الملخص

أنشئت مزارع المعلقات الخلوية من كالس سيقان نباتات الجزر carrot (*Daucus carota* L.) وان تعريض الكثافة 3.4× 10^5 خلية مل$^{-1}$ للمعاملة الكهربائية 250 فولت/ 5 ملي ثانية شجعت الانقسامات الخلوية وتكوينها 168 من منشأت الكالس التي تطورت لاحقاً إلى مزارع كالس. وادى تعريض مزيج المعلق الخلوي مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi المعزولة من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 الى تحفيز الانقسامات الخلوية مبكراً وانتجت232 من منشأت الكالس ونجحت في تكوين كتلة حيوية من الكالس. واظهرت نتائج اضافة محلول PEG (Mwt. 6000) إلى مزيج المعلق الخلوي وبلازميدات Ri تشجيعه تكوين المستعمرات الخلوية وتطورها الى الكالس. واكدت نتائج الترحيل الكهربائي للحامض DNA المضخم بتفاعل PCR وجود حزمة واحدة لكل من الجينات *rol* B و *rol* C اوزانها الجزيئية 850 و650 زوج قاعدة والمماثلة لأوزان البادئات المتخصصة المستخدمة. وتبرهن هذه النتائج بصورة قاطعة تضمين جينات *rol* B و *rol* C في جينوم الكالس الناتج.

الكلمات الدالة: جينات *rol* B و *rol* C، تحضين المعلقات الخلوية، بلازميدات pRi.

Detection of *rol* B and *rol* C Genes in Callus Tissues Derived from Co-cultivation of Carrot (*Daucus carota* L.) Cell Suspension With pRi

Mozahim K. Al-Mallah
Department of Biology/ College of Education
University of Mosul

Amjad A. Mohammed
Department of Biology/ College of Science/
University of Mosul

ABSTRACT

Cell suspension cultures were produced from stem calli of carrot seedlings. Exposure of suspension of 3.4 x 10^5 cell ml^{-1} to 250 V/ 5 msec. stimulate their divisions producing 168 callus primordia, which developed to culture of callus. Whereas exposure of the mixture of cell suspension with 50 µl of pRi plasmid, which isolated from *Agrobacterium rhizogene*s R1601 promoted the sequences of cellular division producing 232 callus primordia successed in forming cultures of callus as well. Addition of PEG (Mwt.6000) solution to cell suspension-plasmid mixture accelerate the colony formation which developed to callus culture as well. Data of the amplified (PCR) DNA electrophoresis demonstrated the development of two bands represented the *rol* B and *rol* C genes. Their molecular weight was 850 bp and 650 bp which are similar to the m wt. of the used primers. These results demonstrated the inclusion of these genes in genomic DNA of produced callus.

Keywords: *rol* B and *rol* C genes, cell suspension Co-cultivation, pRi plasmids.

المقدمة

يسود استخدام بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* او بلازميداتها Ri في التحول الوراثي للنباتات باعتبارها ناقلاً طبيعياً للجينات وتضمينها في الحامض النووي DNA الكروموسومي للخلايا المستقبلة (Gelvin, 2003). وقد نجحت بلازميداتها في التعديل الوراثي لبعض الانواع كما في الحلبة (المهداوي، 2013)، والقرنفل (النعمة، 2010). وتمثل المعلقات الخلوية أنظمة استقبال المادة الوراثية المرغوب تضمينها وانتاج نباتات محولة وراثياً. ويعتمد نجاح هذا النوع من التحول الوراثي على حشر مجموعة جينات T-DNA داخل جينوم الخلية النباتية يتبعه احتمالات نجاح التعبير الجيني من عدمه (Morris *et al*., 1999). ويحوي القسم الايسر من T-DNA مجموعة *rol genes* المعروفة في احداث التحول وتحفيز بناء الاوكسينات في النسيج النباتي المحول وراثياً (Gelvin, 2003)، ويعزى للجين *rol* B مسؤولية الانقسامات الخلوية متأثرة بنوع وتركيز منظم النمو المضاف الى الوسط الغذائي (Altamura, 2004) ويتركز دور جين *rol* C في التزهير المبكر (العنزي، 2013). وتساعد الصدمة الكهربائية في تضمين المادة الوراثية في جينوم الخلية المستقبلة وكذلك مركب PEG (Polyethylene glycol) (Davey *et al*., 2005). وقد نجحت طريقة التثقيب الكهربائي في تضمين الجينات مباشرة في خلايا الكائنات الحية النباتية والحيوانية والفطريات والبكتريا (Bayrac, 2004). وتعبر نتائج تضاعف الحامض النووي الجينومي بوساطة PCR عن تضمين جينات *gfp* داخل جينوم نباتات الجزر (Baranski *et al*., 2006). واحتفاظ نباتات *Anglica gigas* المحولة وراثياً بمجموعة *rol*-genes (Park, 2010).

افترضت الدراسة الحالية لتضمين جينات *rol* B و *rol* C في خلايا المعلقات الخلوية للجزر ومدى احتفاظها في انسجة الكالس الناتج منها.

مواد العمل وطرائقه

عزل بلازميدات pRi:

عزلت بلازميدات pRi من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* السلالة R1601 النامية على وسط APM(Morgan *et al*., 1987) المدعم بإضافة 100 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من الكانامايسين والكاربنسيلين، بوساطة انزيم اللايسوزايم (Brinboim and Doly, 1979).

انشاء مزارع المعلقات الخلوية وتقدير كثافاتها

استحدث الكالس الهش من السيقان تحت الفلقية لبادرات الجزر (الصنف المحلي) المعقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورايد الصوديوم NaOCl على وسط الاستحداث الصلب MS+1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA+1.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA (Mohammed and Al-Mallah, 2014). اضيف غرام واحد من الكالس إلى 30 مل من وسط استحداثه بحالته السائلة ووضعت العينات في الحاضنة الهزازة (New Brunsiwch, USA) في ظروف الظلام / 25 م° / 100 دورة/ دقيقة (Latif *et al*., 2007) ولمدة 48 ساعة. رشحت المزارع بوساطة مناخل بلاستيكية دقيقة قطر فتحاتها 46 µm (Plant Genetic Manipulation Group, Nott. Univ., UK) إلى دوارق معقمة للحصول على مجاميع الخلايا المفردة. أعيدت المزارع إلى نفس ظروف التحضين. حددت كثافتها بنقل 100 مايكروليتر من المعلق الخلوي بعد 24، 48، 72، 96 ساعة من تحضينها باستخدام الهيموسايتوميتر (Davey and Anthony, 2010)، وبلغت (1.9، 2.6، 3.4، 2.5)× 10^5 خلية مل$^{-1}$ على التوالي. واعتمدت كثافة اليوم الثالث 3.4 x 10^5 خلية مل$^{-1}$ في تجارب الدراسة.

الزراعة المرافقة لبلازميدات pRi مع المعلقات الخلوية تحت تأثير المعاملة الكهربائية

مزج مليلتر واحد من معلق الخلايا المترسبة كثافتها 3.4×10^5 خلية مل$^{-1}$ النامية في الوسط السائل MS + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من NAA و BA مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi ومن ثم تعريض المزيج للفولتيات 200، 250، 300، 350 فولت/ 5 ملي ثانية لكل معاملة داخل حجرة جهاز التحفيز الكهربائي (Al-Mallah, 2002). وبصورة مماثلة

عرضت عينات من الخلايا المترسبة بالكثافة ذاتها لوحدها للصدمة الكهربائية وبنفس الظروف كعينات للمقارنة، وبعد الانتهاء من تعريض جميع العينات زرعت بطمرها في قطرات الاكار (Davey and Anthony, 2010 ; Dixon, 1985).

الزراعة المرافقة لبلازميدات pRi مع خلايا المعلقات الخلوية تحت تأثير المعاملة الكيمياوية

أخذت خمسة عينات (1.0 مل / عينة) من معلق الخلايا المترسبة المهيئة مسبقاً ومزج كل منهاً مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi في خمسة انابيب زجاجية معقمة سعة 10 مل/قنينة. أضيف اليها على التوالي 1.0، 2.0، 3.0، 4.0 ، 5.0 مل من محلول 20% أثيلين متعدد الكلايكول، PEG، (Mwt.6000) وحضنت لمدة 15 دقيقة مع تحريكها بهدوء. بعدئذٍ أضيف إلى المزيج 3.0 مل ماء مقطر معقم ونبذت مركزياً (100 دورة/ 5 دقائق) أزيل الرائق الذي يمثل مزيج الوسط الغذائي والماء المقطر ومحلول PEG. ثم اضيف الى الخلايا المترسبة 3.0 مل من الماء المقطر المعقم ونبذت ثانية وأعيدت العملية ثلاث مرات. بعدها زرعت الخلايا بطمرها في قطرات الاكار (ابراهيم وآخرون، 2013).

كما زرعت مجموعة من العينات لوحدها بغياب PEG وزراعتها في الاكار كعينات مقارنة.

الكشف عن جينات *rol* B و *rol* C في جينوم انسجة الكالس الناتج من الزراعة المرافقة لبلازميدات Ri مع المعلق الخلوي

عزل الحامض النووي DNA من عينات الكالس (المشتق من المعلقات الخلوية (المقارنة) ومن الكالس الناتج من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات pRi اما تحت تأثير الصدمة الكهربائية (250 فولت/ 5 ملي ثانية) او بوجود محلول PEG). باستعمال محلول الاستخلاص Cetyl trimethylammonium bromide CTAB (Weigand *et al*., 1993). وقدر تركيز ونقاوة الحامض DNA المعزول من الانواع الثلاثة من الكالس وكذلك الحامض النووي p-DNA المعزول من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 طيفياً (Biodrop Spectrophotometer, England) عند الطوليين الموجيين 260، 280 نانوميتر (Dhahi *et al*., 2011). رحلت انواع الحامض DNA المعزولة كهربائياً في هلام الاكاروز 1% (Electrophoresis MS Mini, U.K.) بإمرار تيار كهربائي بفرق جهد 40 فولت لمدة ثلاث ساعات. وشخصت حزم الحامض بوجود محلول بروميايد الايثيديوم بتعريضها للأشعة فوق البنفسجية UV (UVUP, Taiwan) (Weigand *et al*., 1993) ثم صورت فوتوغرافياً.

ضخمت عينات الحامض DNA المعزولة اعلاه بواسطة PCR للكشف عن التحول الوراثي ومدى احتفاظ الخلايا بجينات *rol* B و *rol* C في جينومها، وانتخبت البادئات المتخصصة (Alpha DNA, Canada) في ادناه وبتعاقب للنيوكليوتيدات (Park *et al*., 2010):

rol B 5` TCACAATGGATCCCAAATTG 3`
3` TTCAAGTCGGCTTTAGGCTT 5`

rol C 5` ATGGCTGAAGACGACCTGTGT 3`
3` TTAGCCGATTGCAAACTTGCA 5`

استخدمت أنابيب Premix الحاوية 5.0 مايكروليتر من المزيج (X10 buffer + $MgCl_2$ + KCL + Tris-HCl + dNTPs + انزيم Taq DNA polymerase)، ويضاف اليها مايكروليتر واحد لكل من البادئ الامامي المتخصص بتركيز 10 بيكامول مايكروليتر$^{-1}$ والبادئ العكسي المتخصص و4.0 مايكروليتر من الحامض DNA القالب بتركيز 50 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$. واضيف 9.0 مايكروليتر من الماء المعقم الخالي من الايونات. أدخلت الأنابيب في جهاز التضاعف (Eppendorf Master Personal, Germany). وانتخب برنامج التفاعل دورة واحدة بدرجة حرارة 95 سيليزية لمدة 5 دقائق يتبعها اربعون دورة كل منها تمر بثلاث دورات 45 ثانية بدرجة حراة 95 سيليزية، نفس المدة وبدرجة حرارة 63 سيليزية، دقيقة واحدة بدرجة 72 سيليزية واخيراً دورة لمدة سبعة دقائق بدرجة 72 سيليزية. رفعت الانابيب بعد انتهاء وقت التفاعل ورحلت كهربائياً في الهلامة 2% الاكاروز بإمرار تيار كهربائي عند فرق جهد 35 فولت لمدة ساعتين وبعدها صبغت الحزم بمحلول صبغة بروميايد الايثيديوم وتصوريها فوتوغرافياً.

النتائج

ناتج بلازميدات pRi

بلغ تركيز بلازميدات pRi المعزولة من معلق بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 512 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ ونقاوته 1.8 مؤشراً خلوه من RNA او اية جزيئات بروتينية.

تكوين منشأت الكالس من المعلقات الخلوية المعاملة كهربائياً

اظهرت نتائج زراعة المعلقات الخلوية والمعرضة مسبقاً لمجموعة من معاملات الصدمة الكهربائية تحمل هذه الخلايا لهذه المعاملة، وحفزت المعاملات 200 و 250 فولت/ 5 ملي ثانية انقسامات الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية وتطورها الى منشأت الكالس (الجدول 1).

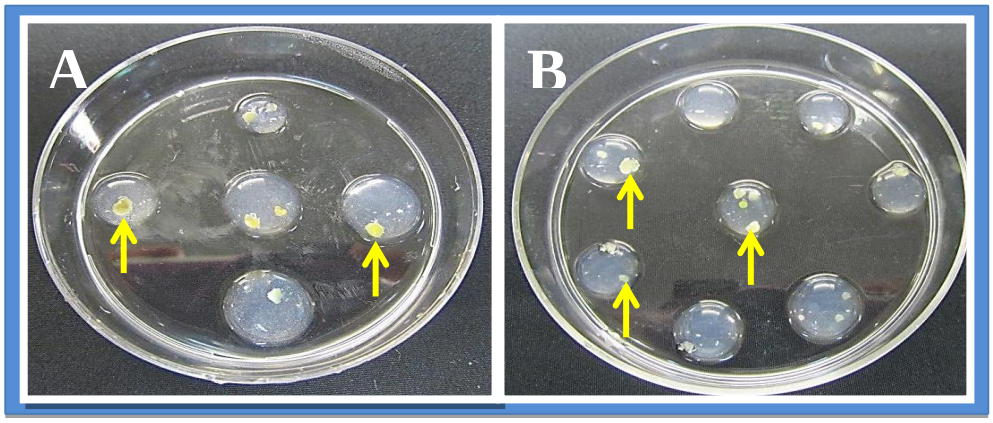
الجدول 1: تكوين منشأت الكالس من المعلقات الخلوية بكثافة 3.4 x 10^5 خلية مل$^{-1}$ المشتقة من كالس سيقان نباتات الجزر *Daucus carota* L. تحت تأثير المعاملة الكهربائية والمزروعة في قطرات الاكار المتعددة

المعاملة الكهربائية (V/msec)	الاعداد الكلية			منشأت الكالس (%)
	للمستعمرات الخلوية الناتجة	للقطرات المكونة للمنشأت	لمنشأت الكالس الناتجة	
المقارنة (بدون معاملة)	42	15	34	50
200/5	77	21	108	70
250/5	112	24	168	80
300/5	63	14	48	47
350/5	26	5	11	17

عدد قطرات الاكار المزروعة 30 / معاملة.

% لمنشأت الكالس= العدد الكلي للقطرات المكونة لمنشأت الكالس / العدد الكلي لقطرات الاكار المزروعة x 100.

ولوحظ قلة أعداد منشآت الكالس المتكونة في عينة المقارنة (الشكل 1 A) وتطورها لاحقاً الى كتلة من الكالس. بينما وجد كثرة اعداد منشأت الكالس الناتجة من الخلايا التي سبق تعريضها للمعاملة 250 فولت / 5 ملي ثانية في قطرات الاكار (الشكل 1 B). وحين نقلها وزراعتها انتجت كتلة من الكالس على وسط الاستحداث اكبر حجماً من كتلته في عينة المقارنة. في حين ثبطت الفولتية العالية 350 فولت/ 5 ملي ثانية انقسامات خلايا المعلق الخلوي المطمورة في الاكار ترتب عنها انخفاض اعداد منشأت الكالس المتكونة.



الشكل 1: منشأت الكالس الناتجة من المعلقات الخلوية لنباتات الجزر التي سبق تعريضها للصدمة الكهربائية والمزروعة في قطرات الاكار.

A- منشأت الكالس المحدودة (المؤشرة بسهم) المتكونة من خلايا المعلق الخلوي بكثافة 3.4×10^5 خلية مل$^{-1}$ المزروعة بطمرها في قطرات الاكار بعد 20 يوماً من زراعتها (المقارنة).

B- منشأت الكالس المتعددة (المؤشرة بسهم) المتكونة من زراعة المعلق الخلوي التي سبق معاملتها بالفولتية 250 فولت/ 5 ملي ثانية المزروعة في قطرات الاكار بعد 18 يوماً من زراعتها.

تكوين منشآت الكالس من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات pRi تحت تأثير المعاملة الكهربائية

تعبر البيانات (الجدول، 2) إلى التباين في اعداد منشآت الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية بعد تحضينها مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi تحت تأثير الصدمة الكهربائية.

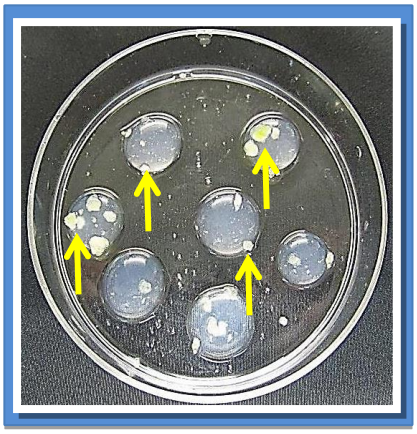
الجدول 2: تكوين منشأت الكالس من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية للكثافة 3.4×10^5 خلية مل$^{-1}$ المشتقة من كالس سيقان نباتات الجزر *Daucus carota* L. مع 50 مايكروليتر من pRi تحت تأثير المعاملة الكهربائية المزروعة في قطرات الاكار المتعددة

المعاملة الكهربائية (V/msec)	الاعداد الكلية			منشأت الكالس (%)
	للمستعمرات الخلوية الناتجة	للقطرات المكونة للمنشأت	لمنشأت الكالس الناتجة	
المقارنة (بدون معاملة)	97	15	53	50
200/5	218	22	196	73
250/5	268	16	232	53
300/5	158	18	106	60
350/5	85	7	43	23

عدد قطرات الاكار المزروعة 30 / معاملة.

لوحظ ان اضافة 50 مايكروليتر من pRi إلى المعلق الخلوي لم تؤثر في حيوية الخلايا وتلوثها وبدء انقساماتها الاولى بعد 8 ايام واستمرت في انقساماتها مكونة المستعمرات الخلوية وتطورها إلى منشأت الكالس بعد 35 يوماً. وتظهر البيانات تحفيز

المعاملة 250 فولت/ 5 ملي ثانية الانقسامات المبكرة لخلايا المعلقات الخلوية ومواصلة انقساماتها وانتاجها منشآت الكالس التي امكن ملاحظتها بالعين المجردة بعد 25 يوماً من الزراعة (الشكل، 2)، والأخيرة تميزت بقدرتها على تكوين مزارع نموذجية من الكالس. في حين ادت المعاملة 350 فولت/ 5 ملي ثانية انخفاضاً ملحوظاً في اعداد المستعمرات الخلوية المتكونة ومنشآتها بعد 40 يوماً. وعموماً انتجت اعداد كبيرة من منشأت الكالس من تحضين المعلق الخلوي مع بلازميدات pRi قياساً بأعدادها الناتجة مع غياب البلازميد والتعريض للمعاملة الكهربائية



الشكل 2: منشأت الكالس (المؤشرة بسهم) الناتجة من زراعة خلايا المعلق الخلوي لنباتات الجزر بكثافة 3.4×10^5 خلية مل$^{-1}$ المحضنة مع 50 مايكروليتر من pRi والمعاملة كهربائياً 250 فولت/5 ملي ثانية والمزروعة بطمرها في قطرات الاكار بعد 15 يوماً من زراعتها.

تكوين المنشآت من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات pRi تحت تأثير الصدمة الكيمياوية

أظهرت النتائج أن مركب PEG بتراكيزه المتباينة المضاف الى مزيج الخلايا وبلازميدات pRi كان محفزاً لانقسامات الخلايا المطمورة في قطرات الاكار وتطور هذه الخلايا وتكوينها المستعمرات الخلوية منتجة منشأت الكالس (الجدول 3).

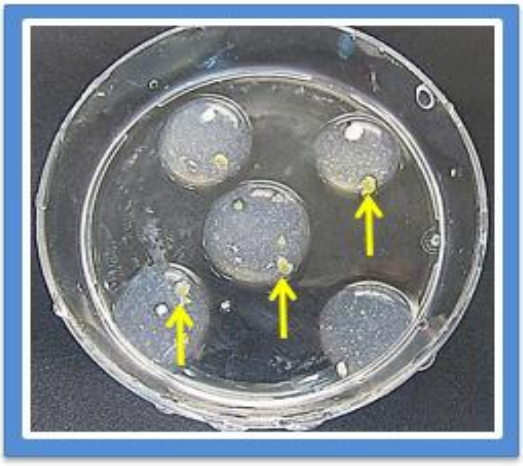
ولوحظ أن إضافة 1.0 مل من محلول 20% PEG شجعت انقسامات الخلايا المطمورة مكونةً المستعمرات الخلوية وتطورها الى منشآت الكالس بعد 20 يوماً (الشكل 3)، واستطاعت هذه المنشآت عند نقلها إلى وسط اكثار الكالس من تكوين مزارعه. وكانت ذات لون اصفر مخضر وهشة القوام.

الجدول 3: تكوين منشأت الكالس المتكونة من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية بكثافة 3.4×10^5 خلية مل$^{-1}$ المشتقة من كالس سيقان نباتات الجزر *Daucus carota* L. مع 50 مايكروليتر من pRi بوجود محلول الإيثلين متعدد الكلايكول (PEG, Mwt. 6000) المزروعة في قطرات الاكار المتعددة

احجام محلول 20% PEG (مل)	الاعداد الكلية			منشأت الكالس (%)
	للمستعمرات الخلوية الناتجة	للقطرات المكونة للمنشأت	لمنشأت الكالس الناتجة	
المقارنة	42	15	34	50
1.0	148	21	114	70
2.0	113	17	93	57
3.0	93	11	59	37
4.0	42	8	12	27

10	4	3	26	5.0

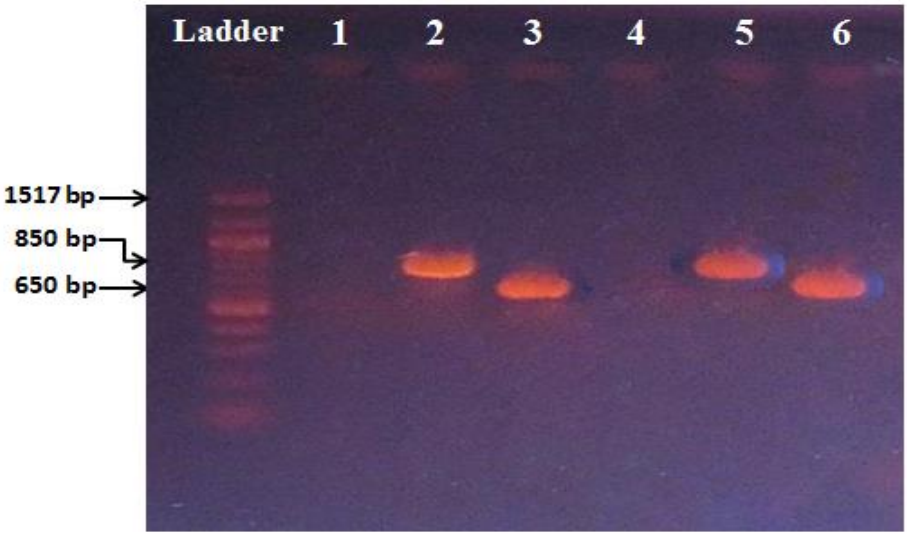
عدد قطرات الاكار المزروعة 30 / معاملة.



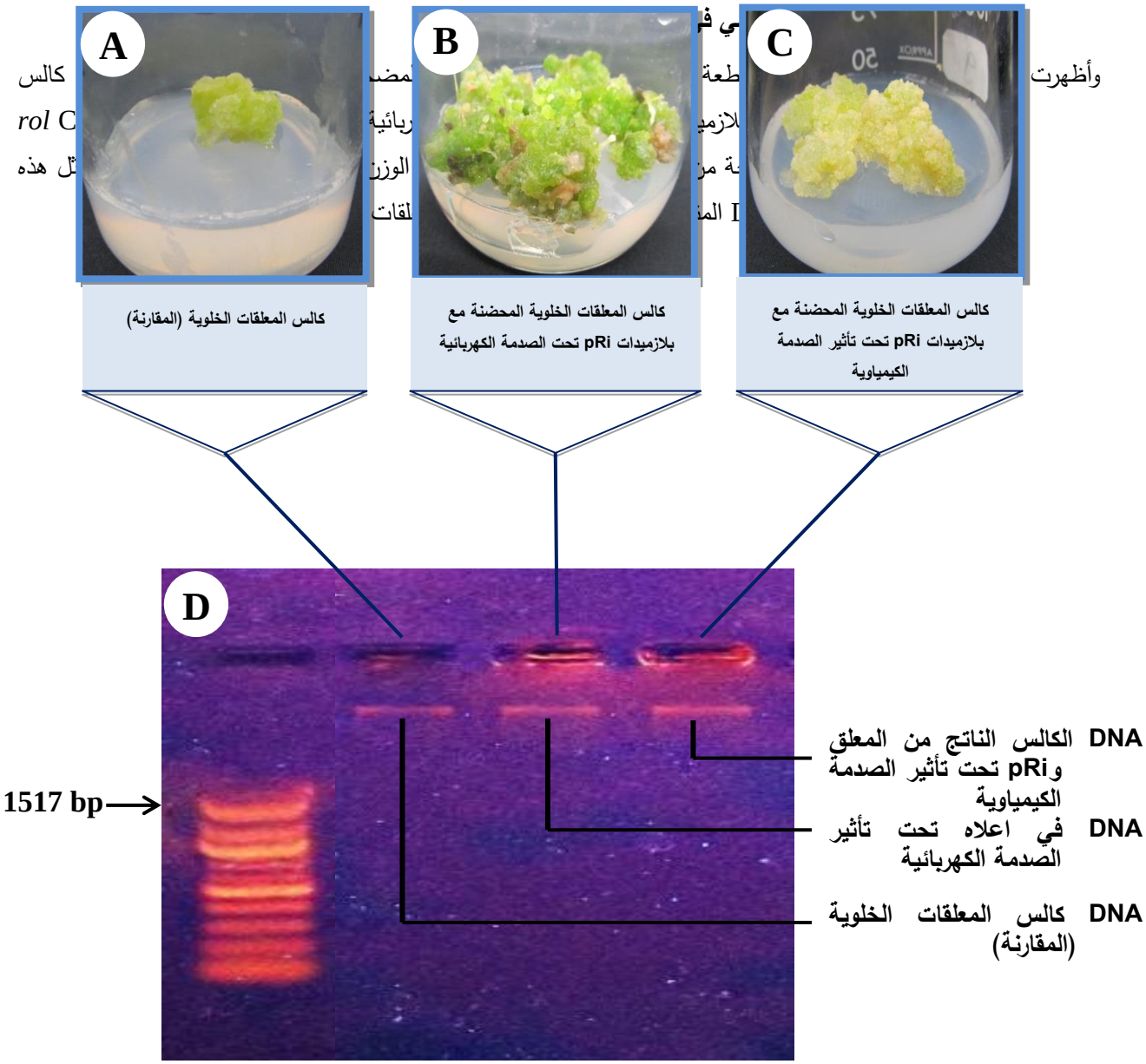
الشكل 3 : منشأت الكالس (المؤشرة بسهم) الناتجة من زراعة خلايا المعلق الخلوي لنباتات الجزر بكثافة 3.4 x 10^5 خلية مل$^{-1}$ والمحضنة مع 50 مايكروليتر من pRi بوجود 1.0 مل من محلول 20% PEG (Mwt.6000) والمزروعة بطمرها في قطرات الاكار بعد 20 يوم من زراعتها.

الاحتفاظ بجينات *rol* B و *rol* C في جينوم انسجة الكالس المشتق من المعلقات الخلوية المحضنة مع بلازميدات pRi تحت تأثير المعاملتين الكهربائية والكيمياوية

اوضحت النتائج ان نقاوة الحامض DNA المعزول من كالس المعلقات الخلوية (الشكل 4 A) وكالسها الناتج من مرافقة بلازميدات pRi تحت تأثير الصدمة الكهربائية (الشكل 4B) او الصدمة الكيمياوية (الشكل 4 C) بلغت 1.8 وسجلت تراكيزه 2415، 2813، 2690 نانوغرام/ مايكروليتر على التوالي بدلالة ظهور حزم الحامض DNA المعزول في طبقة الهلام (الشكل 4 D).



الشكل 4: الحامض النووي الجينومي DNA المعزول من كالس المعلقات الخلوية للجزر *Daucus carota* L. ومن كالسها المحول وراثياً الناتج من تحضينها مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi تحت تأثير المعاملتين الكهربائية



الشكل 5: تواجد جينات *rol* B ، *rol* C في الحامض النووي DNA المضخم لكالس المعلقات الخلوية لنباتات الجزر *Daucus carota* L. المحضنة مع بلازميدات pRi تحت تأثير المعاملتين الكهربائية والكيماوية بواسطة الترحيل الكهربائي في الاكاروز

المسار (1 ، 4): DNA المضخم والمعزول من كالس المعلقات الخلوية (المقارنة).

المسار (2): وجود الجين *rol* B في عينة الحامض DNA المضخم والمعزول من كالس المعلقات الخلوية المحضنة مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi تحت تأثير 250 فولت/5 ملي ثانية.

المسار (3): وجود الجين *rol* C في عينة الحامض DNA المضخم والمعزول من كالس المعلقات الخلوية المحضنة مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi تحت تأثير 250 فولت/5 ملي ثانية.

المسار (5): وجود الجين *rol* B في عينة الحامض DNA المضخم والمعزول من كالس المعلقات الخلوية المحضنة مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi تحت تأثير محلول PEG ولمدة 15 دقيقة.

المسار (6): وجود الجين *rol* C في عينة الحامض DNA المضخم والمعزول من كالس المعلقات الخلوية المحضنة مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi تحت تأثير محلول PEG ولمدة 15 دقيقة.

ان ظهور جينات *rol* B و *rol* C في جينوم كالس المعلقات الخلوية يثبت بصورة قاطعة تضمين بلازميدات pRi فيها وكفاءة الصدمة الكهربائية والتأثير المشجع لمركب PEG في الاستقطاب المباشر للبلازميد pRi.

المناقشة

يفسر نجاح أنشاء المعلقات الخلوية من الكالس الهش للسيقان إلى سهولة انفصال خلاياه واحتوائه على اعداد كبيرة من الخلايا المفردة ويرجح تواصل انقساماتها وتكوينها منشأت الكالس إلى وفرة الاحتياجات الغذائية الضرورية بوجود NAA و BA (Mohammed and Al-Mallah, 2013 ; Neumann *et al*., 2009).

ان استمرار الانقسامات الخلوية وزيادة اعداد المستعمرات الخلوية المتكونة من الخلايا المعاملة كهربائياً وبالذات ظروف المعاملة 250 فولت/5 ملي ثانية قد يعزى الى تكوين فتحات دقيقة في جدر هذه الخلايا وحصولها بشكل افضل على احتياجاتها الغذائية، وايضاً الى تشجيع بناء الحامض النووي للخلايا المعاملة (Joersbo *et al*., 1990). أن عدم تحمل خلايا المعلقات الخلوية للمعاملة 350 فولت/ 5 ملي ثانية والانخفاض الكبير من اعداد منشأت الكالس الناتجة منها يمكن تفسره على اساس فقدان الخلايا حيويتها والذي قد يرجح إلى حدوث خلل في مساراتها الايضة وتحطيم بروتيناتها واحماضها النووية مؤثراً على انقساماتها (Eing *et al*., 2009). وقد يفسر نجاح الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية للجزر مع بلازميدات pRi ونواتجها من المستعمرات الخلوية ومنشأت الكالس وتطورها إلى مزارع الكالس الى قدرة خلايا المعلقات المفردة على الانقسام بوجود الدعم الهرموني من NAA و BA (Meyer *et al*., 2000)، او بدرجة كبيرة إلى انتقال جينات T-DNA من بلازميدات pRi إلى المادة الوراثية للخلية النباتية (Kunik *et al*., 2001). وأن ناتج مزج المعلقات الخلوية مع بلازميدات pRi تحت تأثير الصدمة انعكس في تبكير الانقسامات الخلوية وتفوق اعداد مستعمراتها الخلوية ومنشأتها عن باقي العينات. ومن المتوقع ان يعزى إلى وجود بلازميدات pRi وتأثير الفولتية وتداخلها في تشجيع بناء الحامض DNA وزيادة معدلات انقساماتها وايضاً تضمين الحامض T-DNA داخل جينوم الخلايا المستقبلة عبر الثقوب المؤقتة المستحثة بفعل الصدمة الكهربائية في جدر خلاياها واغشيتها البلازمية (Joersbo *et al*., 1990)، ان كفاءة المعاملة 250 فولت/ 5 ملي ثانية في تحفيزها تكوين منشأت الكالس دلالة واضحة على تأثر حيوية الخلايا. ومن المؤكد ان يفسر دور مركب PEG في تضمين بلازميدات pRi في هذه الخلايا إلى قدرته المعروفة في دمج الخلايا النباتية فاقدة الجدران (البروتوبلاست) مع بعضها وايضاً الى دوره في الاستقطاب المباشر للحامض DNA في الخلايا (Davey and Power, 1975). وان تفوق التراكيز المنخفضة منه يعود إلى تركيبه الكيمياوي ووجود مجموعة الكاربونيل في جزيئته ذات التأثير السام على الخلية النباتية في التراكيز العالية منه. فضلاً عن احداثه خللاً في نموها لإحداثه زيادة في الشد

الازموزي والشد المائي كونه مركب محب للماء مسبباً انخفاضاً في الوزن الطري للكالس (Kakaei *et al*., 2013). ووجد بأن تعريض الانسجة النباتية إلى تراكيز عالية من PEG يؤثر سلبيا على نمو خلاياها (Al- Taha, 2013).

أن الزيادة في تراكيز الحامض DNA في الانسجة المحولة وراثيا ببلازميد pRi عن نظيراتها غير المحولة وراثياً قد يعود إلى انتقال الجينات المحمولة على T-DNA إلى الخلايا المستقبلة واندماجها مع جينومها وتشجيعها بناء الاحماض النووية والبروتينات (Park *et al*., 2010). أن وجود جينات *rol* B و *rol* C في جينوم انسجة الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية المتضمنة بلازميدات pRi وغيابها في جينوم انسجة المقارنة دليلاً قاطعاً عن تضمين هذه الجينات في جينوم انسجة الكالس المحولة وراثياً (Park *et al*., 2010).

المصادر العربية

ابراهيم، مثنى محمد ؛ الملاح، مزاحم قاسم ؛ الاطرقجي، عمار عمر (2013). الزراعة المرافقة لمعلقات الخلايا المشتقة من العقد الفلقية للحلبة مع بلازميدات pRi تحت تأثير الصدمة الكهربائية وعزل الدايوسجنين من الكالس المحول وراثيا. مجلة ديالى للعلوم الزراعية، **21**، 21−33.

المهداوي، مثنى محمد (2013). التلاعب الوراثي والكهربائي لنباتات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. مع عزل الدايوسجنين والترايكونيلين من المزارع النسيجية المختلفة. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

النعمة، قتيبة شعيب (2010). الزراعة المرافقة لخلايا المعلقات الخلوية المشتقة من كالس اوراق القرنفل *Dianthus caryophyllus* مع بلازميدات Ti. مجلة تكريت للعلوم الصرفة، **15**، 68−73.

العنزي، امجد عبد الهادي محمد (2013). احتفاظ نباتات الجزر *Daucus carota* L. بمجموعة *rol-genes* الناتجة من انسجته المحولة وراثياً ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Al-Mallah, M.K. (2002). Invention of electroporator (Al-Jihad 1) and its application in plant tissue culture. Patent No. 3033. Office of Standardization and Quality Control. Baghdad, IRAQ.

Al-Taha, H.A.K. (2013). Effect of shock and gradual drought by PEG on callus growth and proline accumulation in sour orange (*Citrus x aurantium*). *Adv. Agricult. Botanic*., **5**, 77-83.

Altamura, M.M. (2004). *Agrobacterium rhizogenes rol B* and *rol D* genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult*., **77**, 89-101.

Baranski, R. ; Klocke, E.; Schumann, G. (2006). Green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium rhizogenes* mediated carrot transformation. *Plant Cell Repts*., **25**, 190–197.

Bayrac, A.T. (2004). Optimization of a regeneration and transformation system for Lentil, *Lens culinaris* M. cv. Sultan-1, cotyledonary petioles and epicotyls. M. Sc. Thesis. The Graduate School of Natural and Applied Sciences. Middle East Technical Univ.

Brinboim, H.C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res*., **7**,1513-1523.

Davey, M.R.; Power, J.B. (1975). Polyethylene glycol-induced uptake of micro-organisms into higher plant protoplasts: An ultrastructural study. *Plant Sci. Lett*., **5**, 269-274.

Davey, M.R.; Anthony, P.; Power, J.B.; Lowe, K.C. (2005). Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. *Biotech. Adv.*, **23**,131–171.

Davey, M.R.; Anthony, P. (2010). Plant Cell Culture Essential Methods. Wiley-BlackWell, UK.

Dhahi, S.J.; Al-Assie, A.H.; Omear, H.A. (2011). Application of the randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker to analyze the genetic variability in species of the fungus *Alternaria*., *Raf. J. Sci*., **22**, 1-16.

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

Eing, C.J.; Bonnet, S.; Pacher, M.; Puchta, H.; Frey, W. (2009). Effects of nanosecond pulsed electric field exposure on *Arabidopsis thaliana*. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*.,**16**, 1322-1328.

Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., **67**, 16-37.

Joersbo, M.; Brunstedt, J.; Floto, F. (1990). Quantitative relationship between parameters of electroporation. *J. Plant Physiol.*, **137**, 169-174.

Kakaei, M.; Mansouri, M.; Abdollahi, M.R.; Moradi, F. (2013). Effect of NaCl and PEG induced osmotic stress on callus growth parameters of two Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. *Internat. J. Agricult. Crop Sci*., **6**, 127-132.

Kunik, T.; Tzfira, T.; Kapulnik, Y.; Gafni, Y.; Dingwall, C.; Citovsky, V. (2001). Genetic transformation of Hela cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., **98**, 1871-1876.

Latif, Z.K.; Idrees, A.N.; Riazuddin, S. (2007). Indigenous production of synthetic seeds in *Daucus carota*. *Pak. J. Bot*., **39** , 849-855.

Meyer, A.D. ; Tempé, J. ; Costantino, P. (2000). Hairy root: A molecular overview. *Plant Microbe Inter*., **5**, 1-39.

Mohammed, A.A.; Al-Mallah, M.K. (2013). Determination of β-carotene in Carrot (*Daucus carota* L.) Plants Regenerated from Stems Callus. *Raf. J. Sci*., **24**, 27-36.

Mohammed, A.A.; Al-Mallah, M.K. (2014). Efficient Regeneration of carrot (*Daucus carota* L.) plants from cell suspension derived-callus. *J. Biotech. Res. Cent*.,(Accepted).

Morgan, A.J.; Cox, P.N.; Turner, D.A.; Peel, E.; Davey, M.R.; Gartland, K.M.A.; Mulligan, B.J. (1987). Transformation of tomato using an Ri-plasmid vector. *Plant Sci*., **49** , 37-49.

Morris, P.; Webb, K.J.; Robbins, M.P.; Jorgensen, B. (1999). Application of biotechnology to *lotus* breeding. *News Lett. Sci. Techn*., **28** , 199-228.

Neumann, K.; Kumar, A.; Imani, J. (2009). Plant Cell and Tissue Culture – A tool in Biotechnology. Springer-Verlag Berlin, Germany.

Park, N.I.; Park, J.H.; Lee, C.Y. ; Lee, S.Y.; Park, S.U. (2010). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of β- glucuronidase reporter gene in hairy roots of *Angelica gigas* Nakai. *Plant Omics J.*, **3** , 115-120.

Weigand, F.; Baum, M.; Udupa, S. (1993). DNA Molecular Marker Techniques". Technical Manual. No.20. International Center For Agricultural Research in the Dry Area . Aleppo, Syria.