الزراعة المرافقة لمعلقات الخلايا المشتقة من العقد الفلقية للحلبة مع بلازميدات Ri تحت تأثير الصدمة الكهربائية وعزل الدايوسجنين من الكالس المحول وراثيا .

مثنى محمد إبراهيم* **مزاحم قاسم الملاح**** **عمار عمر الاطرقجي*****

* مدرس - قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة ديالى - muthana1967@yahoo.com
**أستاذ - قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة الموصل- mozahim_kasim52@yahoo.com
** أستاذ - كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل - dr_amar2004@yahoo.com

المستخلص

اجريت الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة والتطبيقات الوراثية في قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل، بهدف الحصول على أنسجة الحلبة المحورة وراثياً من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri المعزولة من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* تحت تأثير الصدمة الكهربائية وتقدير محتواها من الدايوسجنين, فقد بينت نتائج الزراعة المرافقة للكثافات 28.0 و 37.0 ×10^4 خلية/سم^3 من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس العقد الفلقية للحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. ، والمحضنة مع 50 مايكروليتر من بلازميدات Ri ، المعزولة من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 ، تحت تأثير الصدمة الكهربائية 200 ، 250 فولت/50 ملي ثانية. والمزروعة بطمره في قطرات الاكار عن تكوين كتل صغيرة من الكالس ، والتي واصلت نموها وتكاثرها في وسط الادامة. وأثبت الكشف عن الاوبينات في مستخلص هذا الكالس عن انفصال بقع الاكروبين دلالة على تحوله وراثيا. واظهرت البيانات وجود الدايوسجنين في هذا الكالس بدلالة قراءات طيف الاشعة تحت الحمراء(IR) وكروماتوكرافيا السائل العالي الكفاءة (HPLC) ومقارنتها مع العينة القياسية. ومن النتائج البارزة المتحققة في الدراسة الحالية ان الكالس المحور وراثياً حقق محتوى عالياً من الدايوسجنين نسبته 297.7% وهذا يعادل ضعف كميته 161.8% المتواجدة في اوراق النباتات البذرية باعتبارها المواقع الرئيسة لإنتاجه.

الكلمات المفتاحية: الزراعة المرافقة ، المعلقات الخلوية ، الحلبة ، بلازميدات Ri ، الدايوسجنين .

المقدمة

تزايدت الحاجة خلال العقود الأخيرة للعديد من المواد الصيدلانية والطبية والأصباغ (Mulabagal وTsay، 2004)، مما استلزم تسخير تقانات الزراعة النسيجية كالإكثار السلالي السريع وتربية النباتات وتوظيف مزارع الكالس او المعلقات الخلوية أو بعد تحويرها وراثيا بهدف رفع إنتاجية النباتات من هذه النواتج (Mantell وآخرون، 1985). أن المزايا المعروفة للمزارع النسيجية جعلت منها موردا طبيعياً لإنتاج العديد من مركبات الايض الثانوي. إذ اصبحت زراعة الخلايا والأنسجة تمثل مصدرا نموذجيا معروفاً لإنتاج المركبات الصيدلانية بكميات كبيرة وسرعة عزلها وبصورة مستمرة بعيدا عن قيود الظروف البيئية وعدم تداخلها مع مركبات أخرى, كما يحصل في حـال استخلاصها من النبات الكامـل (Karuppusamy، 2009). وتعد نباتات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. واحدة من النباتات البقولية الشائع استعمالها لفوائدها المتعددة

تاريخ استلام البحث 19 / 6 / 2013 .

تاريخ قبول النشر 29 / 9 / 2013 .

إذ تستعمل أزهارها وقرناتها ونمواتها الخضرية الطرية غذاء للإنسان في حين تستعمل بذورها وأزهارها وأوراقها المجففة كتوابل، ويعزى التأثير البيولوجي والصيدلاني للحلبة إلى تنوع محتواها من القلويدات والستيرويدات والمواد الفينولية والزيوت الطيارة ذات القيمة الطبية (Petropoulos، 2002). وتشكل الكلايكوسيدات Glycosides جزءا مهماً من المواد الفعالة طبياً في نباتات الحلبة وتضم الكلايكوسيدات الصابونية الاسترويدية التابعة إلى مجموعة التربينات الثلاثية Triterpene، ويعد الدايوسجنين احد أهم مركباتها (Cave، 1999). وتعد الزراعة المرافقة Co-cultivation من التقانات الحديثة التي تتطلب مزج المعلقات الخلوية او معلقات البروتوبلاست مع البكتريا او بلازميداتها المعزولة منها (Hooykaas و Beijersbergen ، 1994). وهذا يمكن إنتاج نباتات محولة وراثياً ويستلزم نجاح هذا التحول دخول المادة الوراثية واندماجها مع المادة الوراثية لخلية العائل ومن ثم قابليتها على التعبير مع توفر صفة ثباتها (Morris وآخرون، 1999). وتعد تقانة التثقيب الكهربائي Electroporation واحدة من إمكانيات تضمين الجينات مباشرة في الخلايا, وقد استعملت بشكل كفوء في أحداث التحول الوراثي في خلايا الكائنات الحية المختلفة كالبكتريا والفطريات والخلايا الحيوانية والنباتية (Bayrac ، 2004).

تهدف الدراسة الحالية الى الحصول على أنسجة الحلبة المحورة وراثياً من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri المعزولة من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* تحت تأثير الصدمة الكهربائية وعزل الدايوسجنين منها .

المواد وطرائق البحث

المادة النباتية

عقمت بذور الحلبة سطحياً بغمرها في محلول هايبوكلوريتَ الصوديوم NaOCl بتركيز 6% بنسبة 1 حجم مادة معقمة:2 حجم ماء معقم لمدة خمس دقائق ، وتغسل البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات بمعدل ثلاث دقائق/ مرة لإزالة أثار المادة المعقمة (ياسين ،2000). تستعمل البادرات المعقمة الناتجة على وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو مصدراً للحصول على القطع النباتية.

انشاء مزارع المعلقات من كالس العقد الفلقية

يستحدث الكالس من العقد الفلقية للحلبة باستخدام املاح وسط MS الصلب مدعماً بإضافة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$BA و1.0 ملغم لتر$^{-1}$NAA (ياسين ، 2000) ، وحضنت العينات في غرفة النمو بدرجة 25± 2ْم ومدة اضاءه (16 ساعة ضوء / 8 ساعة ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس.

ينقل غرام واحد من الكالس الهش الفتي الى 50 مل من وسط الاستحداث بحالته السائلة, وتحفظ العينات في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 28°م في ظروف ظلام تام لمدة 24 ساعة (Morris وFlower ، 1981). يعقبها إمرار المزرعة المتكونة من منخل دقيق معقم حجم فتحاته 46 مايكروميتر نوع (Plant Genet. Manipulation Lab. Nott.U.K) لعزل الخلايا المفردة والتخلص من التجمعات الخلوية الكبيرة ، وبعد السماح بركود واستقرار خلايا المعلق الخلوي داخل كابينة الزرع لمدة 4 ساعات والتخلص من الوسط السائل بسكبه بعناية دون فقد للخلايا الراكدة. يعاد تعليق هذه الخلايا في وسط غذائي جديد مدعم بنفس تراكيز منظمات النمو السابقة (Dixon, 1985).تعاد المزارع الى الحاضنة الهزازة في ظروف التحضين نفسها لمتابعة انقسام الخلايا. وتحدد كثافتها بأخذ 0.1 مل من المعلق الخلوي بأعمار 48 و72 ساعة باستخدام الهيموسايتوميتر (Purohit ،2007).

عزل بلازميدات Ri من بكتريا *A. rhizogenes*

استخدمت السلالة المعدلة وراثياً R1601 من بكتريا *A. rhizogenes* حاملةً العلائم الوراثية لصفة مقاومة المضادين الحيويين الكانامايسين Kanamycine ($Kana.^{Res+}$) والكاربنسيلين Carbenicilline ($Carb.^{Res+}$) النامية على وسط APMالسائل (Morgan وآخرون ، 1987). وتعزل بلازميدات Ri باستخدام الطريقة المعتمدة من قبل Brinboim و Doly (1979).

ويحسب تركيز البلازميد ونقاوته وفق المعادلة الاتية:

$$\text{DNA concentration}(\mu g/ml) = \text{Absorbance}_{260} \times 50 \times \text{Dilution Factor}$$

إذ ان:50: حجم المزرعة

$$\text{DNA purity} = \text{Absorbance}_{260} / \text{Absorbance}_{280}$$

(Sambrook وآخرون ، 1989)

الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri تحت تأثير المعاملة كهربائياً.

تؤخذ الخلايا المترسبة من 10 مل من المعلق الخلوي المشتق من كالس العقد الفلقية وبكثافات 28.0 ، 37.0 ×10^4 خلية/$سم^3$ بوساطة طردها مركزيا عند سرعة 1000 دوره/دقيقة ويعاد تعليقها بإضافة 10مل من الوسط MS السائل + 2.0 ملغم لتر$^{-1}$BA + 1.0ملغم لتر$^{-1}$NAA ، مترافقاً مع 50 مايكروليتر من بلازميد Ri. ويعرض هذا المزيج الى 200، 250 فولت وبنبضات مفردة أمدها 50 ملي ثانية بناء على تجارب اولية, وبعد الانتهاء من تعريضها يضاف الى المزيج المعامل 10 مل من الوسط MS + 2.0 ملغم لتر$^{-1}$BA + 1.0ملغم لتر$^{-1}$NAA المصاب بإضافة 3% اكار والمعقم مسبقاً ومحافظاً لحالته السائلة في حمام مائي بدرجة 45°م، يمزج جيداً ويزرع بتقانة قطرات الاكار المتعددة (المهداوي ، 2013).

تنقل منشآت الكالس المتكونة عند بلوغها حجم حبة الحمص وبزوغها من قطرات الاكار بوساطة ملقط معقم إلى سطح 20 مل من الوسط الصلب MS + 2.0 ملغم لتر$^{-1}$BA+1.0 ملغم لتر$^{-1}$NAA لنموه وإكثاره.

الكشف عن الاكروبين Agropine في الكالس الناتج من الزراعة المرافقة.

ينفذ اختبار الترحيل الكهربائي للكشف عن الاوبينات من نوع الـ Agropine في انسجة الكالس المشتق من الزارعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri تحت تأثير المعاملة الكهربائية للتأكد من تحولها وراثياً (Tepfer وTempe ، 1981).

استخلاص وفصل الدايوسجنين.

يقدر مستوى الدايوسجنين في مستخلصات انسجة أوراق النباتات البذرية النامية برياً في الحقل قبل مرحلة الأزهار, ومن انسجة الكالس المحولة وراثيا الناشئ من الزارعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri تحت تأثير المعاملة 200V/50msec "المنتج للاكروبين". جففت العينات لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 60° م ومن ثم سحقت باستخدام هاون خزفي. اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Sauvaire و Baccou (1978) في عزل ستيرويد الدايوسجنين. اجريت اختبارات أولية للعينات بهدف الكشف عن وجود الصابونيات باستعمال تفاعل سالوكوسكي Salkowski (Gloria وآخرون ، 1998).

التشخيص الكيميائي و النوعي للدايوسجنين بوساطة IR.

توضع قطرات من المستخلصات النباتية لكل عينة في خلية جهاز طيف الاشعة تحت الحمراء IR وسجلت الرسوم البيانية لمواقع المجاميع الوظيفية الرئيسة لمركب الدايوسجنين والتي شملت موقع مجموعة –OH الكحولية و=C-H والالكين C=C والأيثرC-O-Cالمتناظرة وغير المتناظرة.

التشخيص والتقدير الكمي للدايوسجنين بوساطة HPLC.

ينفذ التشخيص بالاعتماد على زمن الاحتباس Retention time في كل من العينات والمحلول القياسي للدايوسجنين (الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في سامراء) بإذابة 0.02 ملغم في 10 مل من الكلوروفورم إذابة تامة. وكان الطور الثابتODS-2, طول العامود 250 ملم ، القطر الداخلي للعامود 4.6 ملم ، قطر حبيبات الحشوة 5 مايكرومتر، أما الطور المتحرك Mobile phase فتكون من 90 % اسيتونتريل و 10% ماء حجم: حجم وبمعدل جريان Flow rate 1.0 مل/دقيقة ، حجم العينة المحقونة 20 مايكروليتر، وبدرجة حرارة 35°م ، وعند الطول الموجي 254 نانوميتر (Ortuno وآخرون ، 1998). تم حساب النسبة المئوية للمركب وفق المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية للمركب} \quad \frac{T}{S} \times 100$$

حيث T : تمثل مساحة المنحنى للمركب المعزول من العينات المختبرة.
S : تمثل مساحة المنحني للمركب القياسي(المقارنة)

النتائج والمناقشة

الحصول على بلازميدات Ri-p-DNA وتقدير كثافته طيفياً.

تشير نتائج عزل بلازميدات Ri من معلق بكتريا*A. rhizogenes* R1601 كفاءة الطريقة المتبعة في عزله نقياً بتركيز 1245 مايكروغرام/ مل وبلغت نقاوته 1.69 دلالة على خلو الحامض النووي البلازميدي من اية مواد بروتينية, واخرى من الحامض النووي RNA.

تكوين منشآت الكالس من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية للعقد الفلقية مع بلازميدات Ri-p-DNA المعاملة كهربائياً

تشير البيانات الواردة (الجدول1) عموماً إلى تباين أعداد منشآت الكالس المتكونة من المعلقات الخلوية للعقد الفلقية المحضنة مع 50 مايكروليتر من بلازميدات pRi المعرضة او غير المعرضة للفولتيتين المنتخبة.

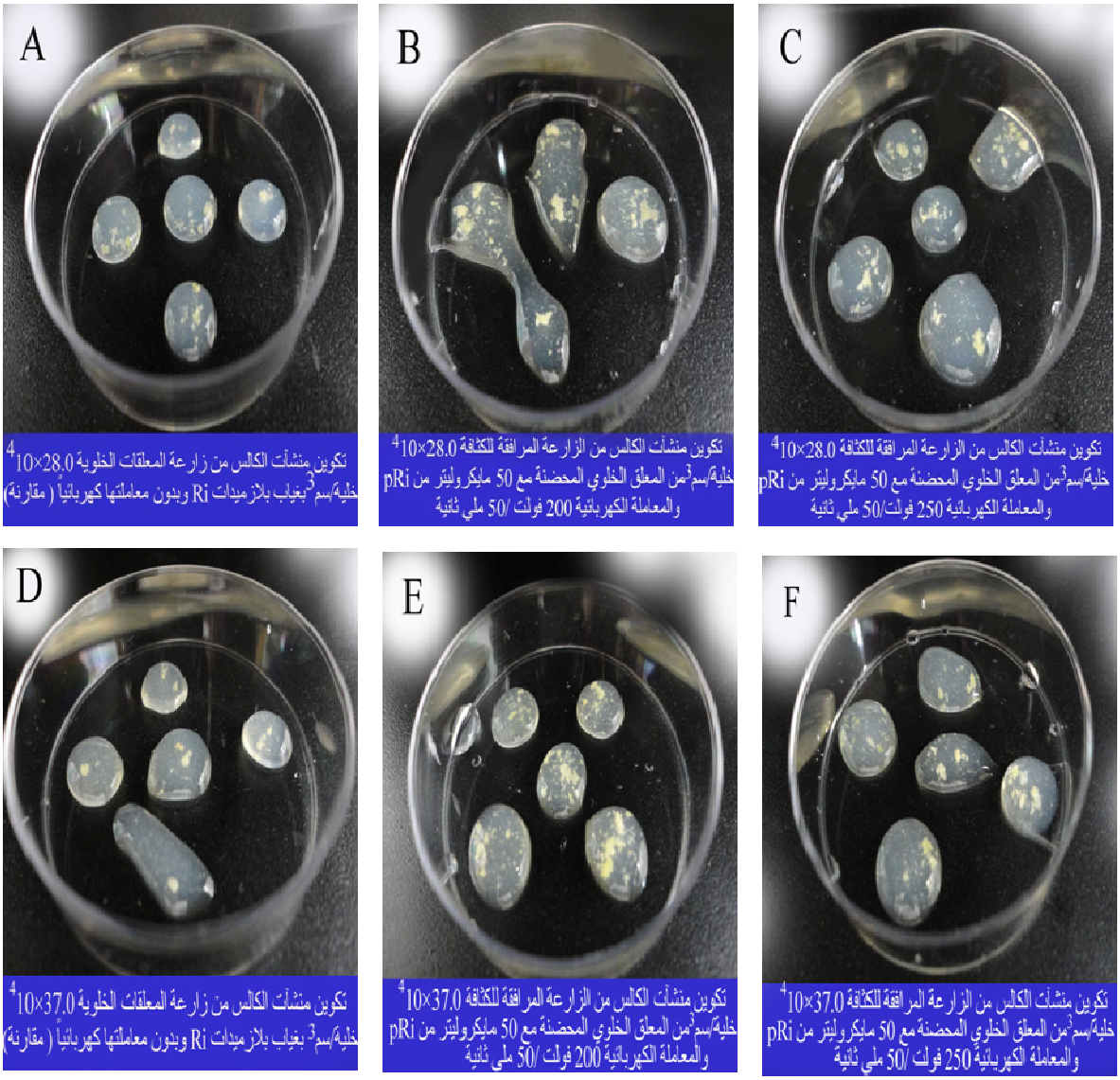
وكذلك تباينت معدلات أعداد منشآت الكالس المتكونة متأثرةً بالكثافة المزروعة والمعاملة المستخدمة. فقد سجلت معدلاتها 6.0 - 15.0 منشآه/قطرة من زراعة الكثافتين 28.0 و37.0 × 10^4 خلية/سم3 قياساً بعينات المقارنة التي تراوحت معدلات أعداد منشآت الكالس فيها 5.0 منشأه/قطرة بغياب تحضينها مع pRi وعدم تعريضها للصدمة. وعموماً أشارت النتائج إلى أن إضافة 50 مايكروليتر من pRi مع الكثافات المختبرة وإخضاعها للفولتيتين المنتخبة شجعت انقسامات الخلايا المطمورة في الاكار. فقد بدأت انقسامها الأول في اليوم الثالث من الزراعة ، وواصلت انقساماتها وتكوين أولى المستعمرات الخلوية بعد 17- 20 يوماً من الزراعة عند فحصها مجهرياً وتطورها إلى منشآت الكالس التي أمكن ملاحظتها بالعين المجردة بعد 30-35 يوما من الزراعة.

جدول1. تكوين منشآت الكالس من الزراعة المرافقة لكثافتين متباينتين من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس العقد الفلقية للحلبة.*T. foenum-graecum L* مع 50 مايكروليتر من بلازميدات Ri تحت تأثير الصدمة الكهربائية في قطرات الاكار المتعددة النامية في الوسط الصلب MS المدعم بإضافة 2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA +1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA.

المعاملة الكهربائية (V/msec)	معدلات أعداد المستعمرات الخلوية/ قطرة	معدلات أعداد منشآت الكالس المتكونة/ قطرة	منشآت الكالس (%)
الكثافة 28.0 ×10^4 خلية/سم^3			
المقارنة	48.8	5.0	10.2
200 / 50	99.3	13.0	13.0
250 / 50	73.3	6.0	8.1
الكثافة 37.0 ×10^4 خلية/سم^3			
المقارنة	57.3	5.0	8.7
200 / 50	101.0	15.0	14.8
250 / 50	76.6	8.0	10.4

وتعبر النتائج عن دور كثافة الزرع في انقسام الخلايا بغياب بلازميدات pRi. فقد تبين أن الكثافة المزروعة 28.0×10^4 خلية/سم^3 شجعت تكوين اعداد من منشآت الكالس (الشكل1 .A). وأدى تعريض مزيج المعلقات الخلوية وبلازميدات Ri للمعاملة 200 فولت/50 ملي ثانية إلى زيادة أعداد المستعمرات الخلوية بشكل ملحوظ انعكس في الأعداد المتكونة من منشآت الكالس (الشكل1 .B) ، في حين أدى تعرض مزيج المعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri لكل من الفولتيات 250 فولت/ 50 ملي ثانية إلى انخفاض ملحوظ في أعداد المنشآت الناتجة (الشكل1.C) بالرغم من تفوقها عن معاملة المقارنة.

وتؤكد نتائج زراعة الكثافة العالية 37.0×10^4 خلية/سم^3 عدم اختلافها عن الكثافة السابقة في مدة ظهور منشآت الكالس وأعدادها (الشكل1 .D). وحفزت المعاملة 200 فولت/ 50 ملي ثانية تكوين المستعمرات الخلوية مبكراً بعد 15- 17 يوماً من زارعة المعلقات الخلوية المترافقة مع بلازميدات Ri ، وانعكس ذلك في تكوين منشآت الكالس بعد 30 يوماً (الشكل1 .E). وأدى تعريض المعلقات الخلوية للمعاملة 250 فولت/50 ملي ثانية إلى زيادة أعداد المستعمرات الخلوية عن معاملة المقارنة ألا أنها سجلت انخفاضاً في أعداد منشآت الكالس الناتجة (الشكل F.1).

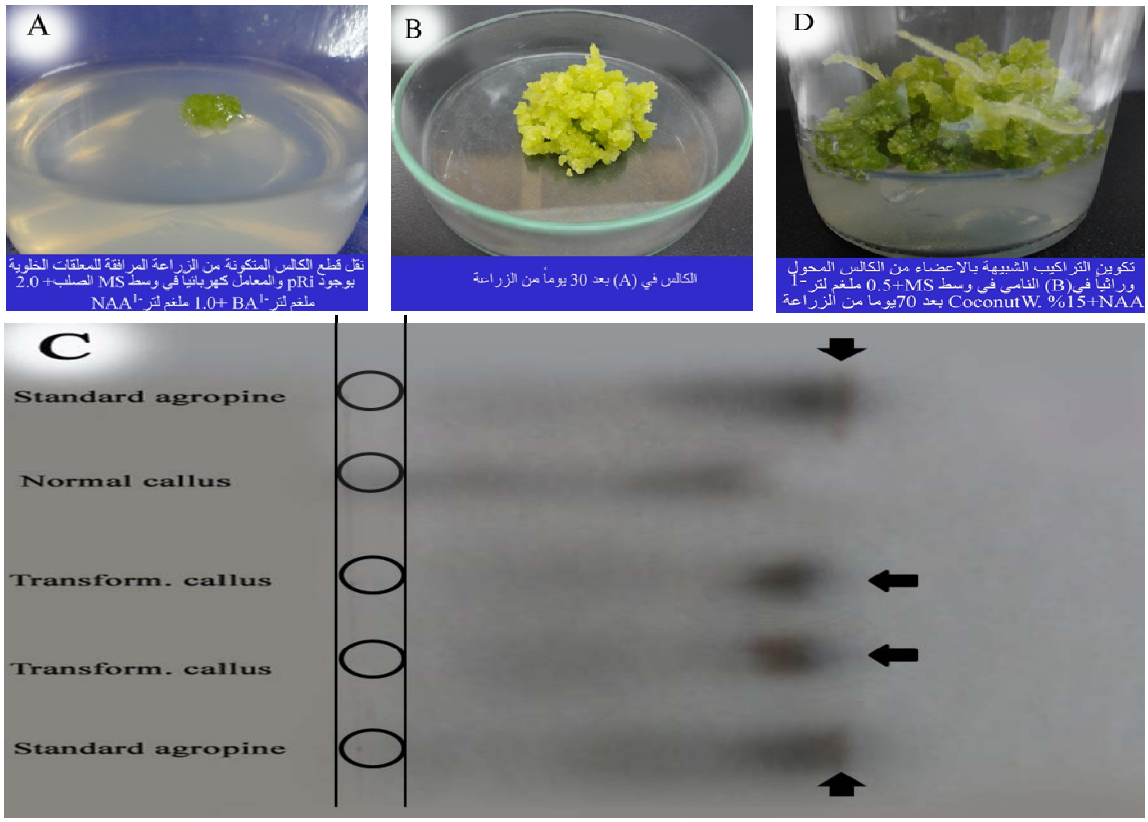


شكل1. تكوين منشآت الكالس من زراعة المعلقات الخلوية بكثافة 28.0 ×10^4 خلية/سم^3 و 37.0×10^4 خلية/سم^3 المشتقة من كالس العقد الفلقية للحلبة *T. foenum-graecum* L. والمحضنة مع 50 مايكروليتر من بلازميدات Ri تحت تأثير المعاملة الكهربائية والمطمورة في قطرات الاكار المتعددة.

تكوين مزارع الكالس المحول وراثياً من منشآته الناتجة من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية للعقد الفلقية مع بلازميدات Ri والمعاملة كهربائياً وتمايزه.

نجحت عملية نقل قطع الكالس المتكونة في قطرات الاكار عند وصول حجمها إلى قدر حبة الحمص (الشكلA.2) الى وسط الاستحداث الصلب MS+ 2.0 ملغم لتر$^{-1}$BA + 1.0 ملغم لتر$^{-1}$NAA مما شجع نموها خلال ثلاثين يوماً وتكوينها مزرعة كالس (الشكلB.2) ذات لون أخضر فاتح وقواماً حبيبياً هشاً وامتاز بسرعة نموه.

وأكدت اختبارات الكشف عن الحامض الاميني "الاكروبين" في جميع عينات الكالس ، ثبوت التحول الوراثي في عينتين من الكالس الناتج من مزارع المعلقات الخلوية المحضنة مع 50 مايكروليتر



شكل2. الحصول على الكالس المحول وراثياً الناتج من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس العقد الفلقية للحلبة *T. foenum-graecum* L. مع بلازميدات Ri تحت تاثير المعاملة الكهربائية بدلالة انفصال الاكروبين بوساطة الترحيل الكهربائي.

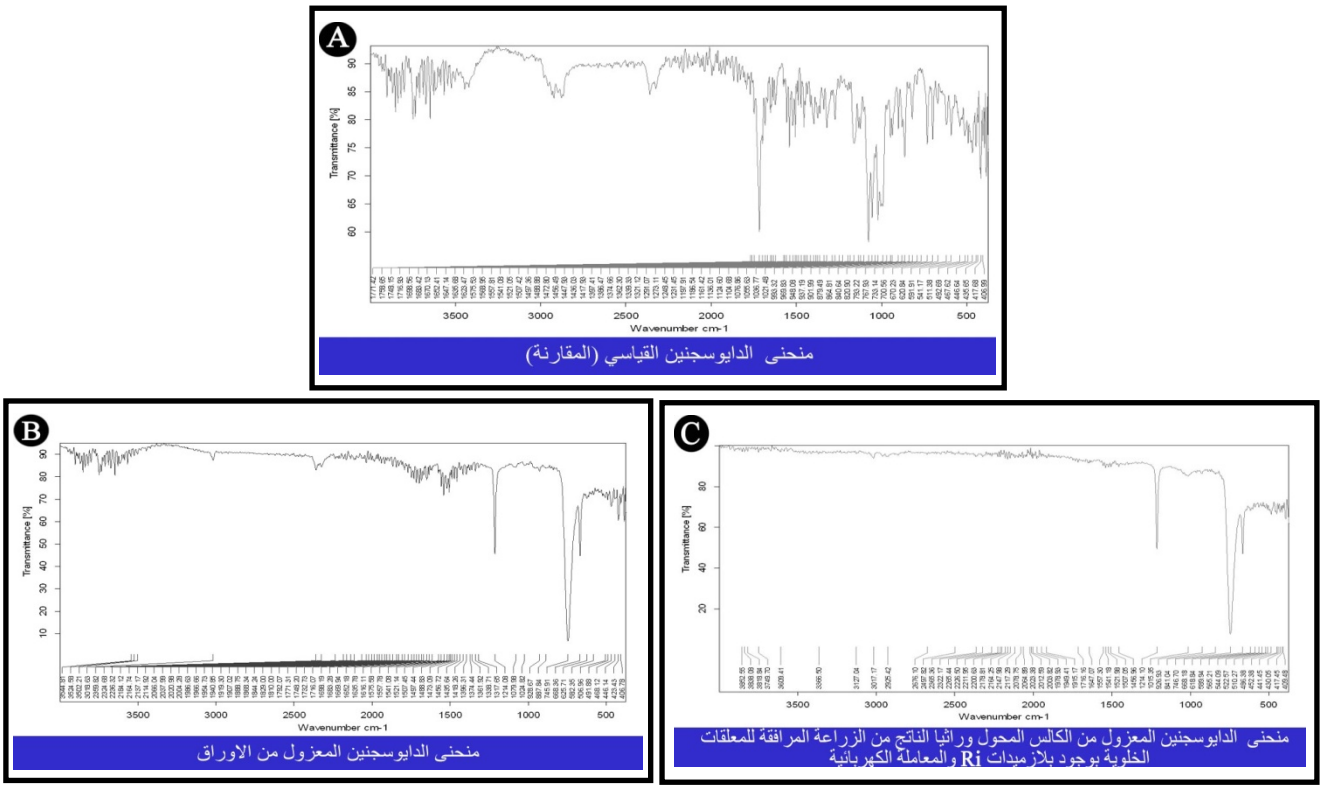
من بلازميدات Ri والمعاملة كهربائياً بالفولتية 200 فولت/50 ملي ثانية من مجموع العينات المختبرة بدلالة انفصال بقع هذا النوع من الاوبينات (الشكلC.2).أدى نقله إلى وسط التمايز (MS +0.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA +15% ماء جوز الهند) إلى نشوء بعض التراكيب الشبيهة بالجذور العرضية بعد أعادة زراعتها ثانية(الشكلD.2).

عزل الدايوسجنين من مستخلص انسجة الكالس المحول وراثيا.

اتاح الكشف الكيميائي للمادة المعزولة التحقق مبدئياً من الدايوسجنين المعزول بدلالة كشف سالوكوسكي Salkowski الموجب محدثاً لوناً احمر دلالة وجود الستيرويدات الصابونية.

التشخيص الكيمياوي والنوعي للدايوسجنين بوساطة IR .

اشارت قيم طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) وجود المجاميع الرئيسة الفعالة لمركب الدايوسجنين وتقاربها مع قيم هذه المجاميع في منحني الدايوسجنين القياسي. فقد ظهرت حزم الامتصاص عند مدى الترددات3609.4 سم$^{-1}$ مقاربة لتردد الحزمة في العينة القياسية 3649.9 سم$^{-1}$ وعائديتها الى تردد مط مجموعة الهيدروكسيل(–OH) الكحولية. وظهور قمة واضحة عند التردد 2925.4 سم$^{-1}$ وجود مجموعة (C-H) الاليفاتي المقاربة لتردد العينة القياسية 3008.3 سم$^{-1}$, وحزم للآصرة المزدوجة ضمن الصيغة التركيبية للدايوسجنين متكونة عند المدى 1647.0 سم$^{-1}$ والمقاربة



شكل3. منحنيات الامتصاصية لطيف الاشعة تحت الحمراء(IR) للدايوسجنين القياسي(A) والمعزول من اوراق(B) والكالس المحول وراثياً لنباتات الحلبة.*T. foenum-graecum* L .

لتردد مجموعة الالكين (C=C) 1635.6 سم$^{-1}$ في العينة القياسية. وبينت ترددات مجموعة الايثر (C-O-C) المتناظرة عند التردد 1338.6 سم$^{-1}$ وغير المتناظرة عند التردد 926.9 سم$^{-1}$ تطابقها مع ترددات العينة القياسية مما يدل على ان الدايوسجنين هو الستيرويد المعزول من جميع العينات بدلالة تطابق مواقع امتصاص هذه الأطياف في العينة القياسية(الشكلA.3) مع أطياف امتصاص المادة المعزولة من مستخلصات أوراق النباتات البذرية (الشكلB. 3) والكالس المحول وراثياً (الشكلC.3).

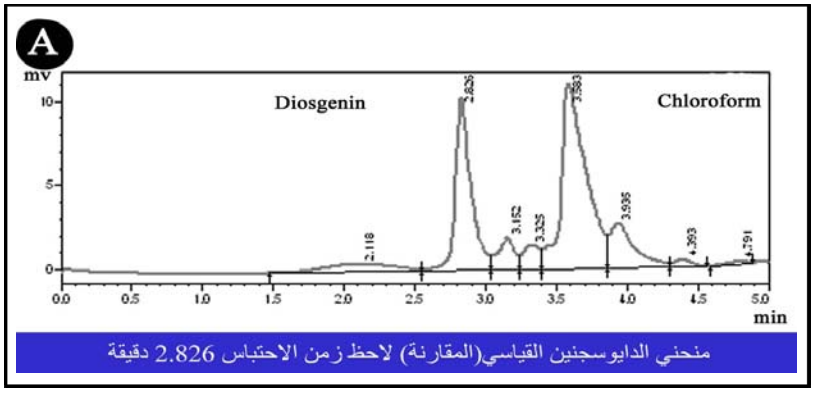
تشخيص الدايوسجنين وتقديره كمياً بوساطة HPLC.

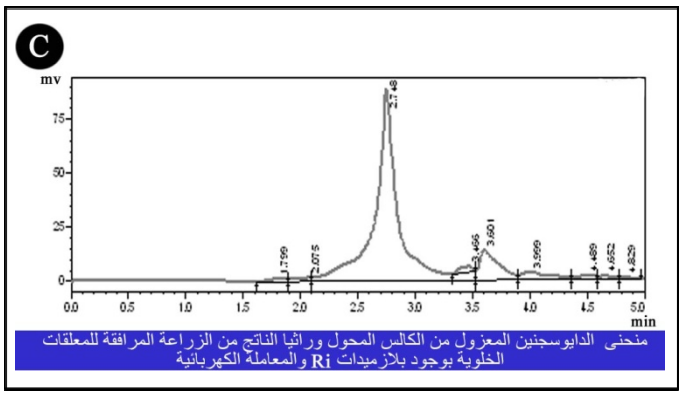
اظهر التقارب في قيم زمن احتباس الدايوسجنين القياسي مع زمن احتباس الدايوسجنين المعزول من مستخلص اوراق النباتات البذرية ، فضلا عن الكالس المحول وراثياً المشتق من زراعة المعلقات الخلوية مترافقة مع بلازميدات Ri والمعاملة كهربائياً, والذي تراوح بين 2.748-2.768 دقيقة قابلية هذه المزارع في انتاج الدايوسجنين (الجدول2).

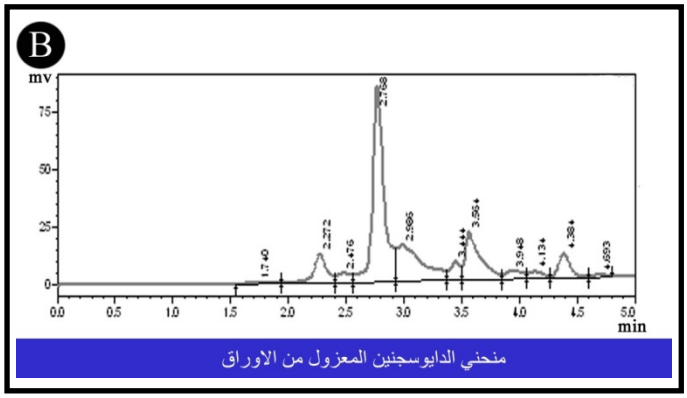
جدول2. قيم زمن احتباس الدايوسجنين ونسب وجوده في الكالس المحول وراثياً المتكون من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri والمعرضة للمعاملة الكهربائية في نباتات الحلبة *T. foenum-graecum* L. .

مصدر الدايوسجنين		زمن الاحتباس (دقيقة)	مساحة المنحنى (%)	وجود الدايوسجنين (%)
الدايوسجنين القياسي	المقارنة	2.826	27.109	100
النباتات البذرية	الاوراق	2.768	43.889	161.8
الكالس المشتق من المعلقات الخلوية المحولة ببلازميدات Ri والمعاملة كهربائياً		2.748	80.717	297.7

وتشير النتائج الى وجود اختلافات في نسبة مساحة المنحني المسجلة للدايوسجنين القياسي (الشكل4.A) مع نسب منحنياته المعزولة من أوراق للنباتات البذرية (الشكل4.B) ، وتظهر نتائج تقدير نسبة الدايوسجنين في هذه الاجزاء في وجوده بنسبة 161.8 %.







شكل4. منحنيات الترايكونيلين للعينة القياسية(A) والمعزول من اوراق(B) النباتات البذرية والكالس المحول وراثياً المشتق من الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri تحت تأثير الصدمة الكهربائية(C) لنباتات الحلبة *T. foenum-graecum* L. بوساطةHPLC.

وتشير منحنيات الدايوسجنين المسجلة من مزارع الكالس المحول وراثياً والمشتق مـن الزراعـة المرافقة للمعلقات الخلوية بوجود بلازميدات Ri والمعاملة كهربائياً (الشكلC.4) ، إلى تفوقها الواضح في إنتاجها لهذا الستيرويد بدلالة نسبة مساحة المنحني الممثل للدايوسجنين المعزول منهـا, إذ تواجـد الدايوسجنين فيه بمقدار 1.8 مرة أكثر من وجوده في الأوراق المواقع الرئيسة لتواجده.

إن مزايا المعلقات الخلوية المشتقة من كالس العقد الفلقية ادى الى تداولها في هذه الدراسة وزراعتها بنجاح لتمثل خطاً منتجاً لنباتات الحلبة(Al-Mahdawe وآخرون ،2013) ، وتمثيلها اتجاهاً حديثاً في مجال التحول الوراثي الحيوي للنبات باستخدام النواقل البكتيرية, فقد اشارت العديد من الدراسات الى استخدام بلازميدات Ri في التحول الوراثي, كما في نباتات الباقلاء (Rech وآخرون ، 1988) والبنجر السكري (الملاح والنعمة ، 2002) ، وقد يفسر نجاح الزراعة المرافقة Co-cultivation لخلايا المعلق الخلوي للحلبة مع بلازميدات Ri بتركيز50 مايكروليتر ونواتجها من المستعمرات الخلوية المنتجة لمنشآت الكالس وتطورها الى مزارع كاملة الى قدرة خلاياها المفردة ، السائدة في هذه المزارع، على الانقسام بسبب دعم بناء الهرمونات فيها وزيادة تراكيزها مسبباً تغيراً في سلوكها ونشاطها (Meyer وآخرون ، 2000). إن النتائج المتحققة من مزج المعلقات الخلوية مع بلازميدات Ri والمعرضة للمعاملة الكهربائية المتمثلة في انقسام خلاياه مبكراً وزيادة مستعمراتها الخلوية المتكونة ومنشآت كالسها الناتجة عنها ، متزامناً مع كثافات الزرع ، من المحتمل ان يسند الى وجود بلازميدات Ri و تأثير المعاملة الكهربائية او تداخلهما معاً الى تشجيع بناء الحامض النووي DNA وزيادة معدلات الانقسامات التي تعاني منها هذه الخلايا (Michael وآخرون ،1982). وقد يفسر الحصول على الكالس المحول وراثياً الى انتقال الحامض النووي Ri-T-DNA الى جينوم الخلية النباتية (Kunik وآخرون ، 2001) ، وتحقق هذا بسبب تجاوز الحواجز الطبيعية متمثلةً بجدر خلاياها واغشيتها البلازمية بفعل الصدمة منتجة ثقوباً مؤقتة تضمن دخول المادة الوراثية الى الخلايا (Joersbo وآخرون ، 1990). وان الكشف الموجب عن الاكروبين في انسجة الكالس ، دليل نجاح تحولها وراثياً (Dessaux وآخرون ، 1998) من المحتمل ان يعزى الى انتقال الجينات المسؤولة عن بناء الاوبينات Opines الموجودة على الموقع الايمن T_R لقطعة T-DNA من بلازميدات Ri الى النبات. ان البكتريا *A. rhizogenes* R1601 المستعملة في الدراسة الحالية معروفة بإنتاجها للاكروبين ومن اكثر السلالات المستعملة كنواقل طبيعية كفوءة في التحول الوراثي للنباتات ومن أمثلتها عنيب الذيب (الملاح وصالح ، 2006) ونظراً للتأثيرات اعلاه فقد استغلت هذه التقانة في التحول الوراثي للأنواع التي تفشل معها الامكانيات الاخرى ومن امثلتها انتاج الكالس المحول وراثياً من المعلقات الخلوية للذرة باستخدام بلازميدات Ri لبكتريا *A. rhizogenes* (Kamm وآخرون، 2002).

إن وجود الدايوسجنين في مزارع الكالس المحول وراثياً بمقدار ضعف نسبة تواجده في الأوراق، المواقع الرئيسة لإنتاجه ، يعبر عن طاقته في بناء هذه المركبات. وهذا قد يعزى إلى التحول الوراثي الحاصل وانتقال قطع T-DNA من بلازميدات Ri واندماجها في جينوم الخلية بشكل عشوائي يترتب عنه اضافة او حذف او اعادة ترتيب تعاقب الوحدات البنائية في الحامض النووي DNA للخلايا المحولة. وبهذه الطريقة فان قطعة T-DNA المنقولة وحسب موقع ارتباطها قد تسبب تنشيط او كبح بعض الجينات في مسار النواتج الايضية الثانوية (Alvarez ،2011).ومن أهم الجينات المستقرة في قطعة T-DNA مجموعة جينات *Onco* genes الحاملة مجاميع جينات *rolA* و *rolB* و *rolC* المعروفة بمسؤوليتها في تنظيم نمو الخلايا وتمايزها عند نجاح تعبيرها بشكل جين مفرد او مجموعة جينات، وفي حث بناء النواتج الايضية في الخلايا المحولة وراثياً في النباتات المختلفة (Bulgakov، 2008) وهذا قد يفسر ايضاً تمايز هذا الكالس.

وعموماً تؤكد هذه الزيادات في مستويات الدايوسجنين في أنسجة كالس الحلبة المحول وراثياً حصول تحوير في بناء او تراكم هذه النواتج الايضية ، مؤشرةً بان المزارع النسيجية المحولة غالباً

تكون مصادر مفضلة ومستديمة للحصول على النواتج الايضية الثانوية وبديلا مناسباً عن النباتات الاعتيادية.

المصادر

الملاح ، مزاحم قاسم وشفاء ، مهدي صالح.2006. تقانة كفوءة للحصول على نباتات عنيب الذيب *Solanumnigrum* L. المعدلة وراثياً بوساطة بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601. مجلة علوم الرافدين، 17(9): 92-107.

الملاح ، مزاحم قاسم وقتيبة ، شعيب النعمة.2002. تأثير المعاملة الكهربائية في تكوين الجذور الشعرية المحولة وراثياً من أوراق نباتات البنجر السكري الملقحة ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601. وقائع ملخصات المؤتمر القطري الثاني لعلوم الحياة. الجامعة المستنصرية. 25-26/كانون الاول.

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.

ياسين ، جاسم محمد. 2000. التحول الوراثي في نباتات الحلبة *Trigonella foenum- graecum* بوساطة بلازميدات Ti و Ri لبكتريا *Agrobacterium* . رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل.

Al-Mahdawe, M.M. , M.K. Al-Mallah and A.O. Al-Attrakchii. 2013. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledonary node's calli of *Trigonella foenum-graecum* L.. *J. Biotech. Res. Cent*.,(Accepted).

Alvarez, M.A. 2011. Genetic Transformation. First ed., Dragana Manestar, Croatia.

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. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res*., 7: 1513-1523.

Bulgakov, V.P. 2008. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv*., 26: 24-31.

Cave, A. (Ed). 1999. Pharmacognosy, Phytochemisty, and Medicinal Plants. Translated by Hatton C.K. Universite' de paris-sud Andover, England, UK, London, New York.

Dessaux, Y. , A. Petit , S.K. Farrand and P.J. Murphy. 1998. Opines and opine-like molecules involved in plant-rhizobiaceae interactions, In: The Rhizobiaceae. Ed. Spaink *et al.* KlumerAcademic Publishers, Netherlands.

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

Gloria, L., I. Lee and A. Kinghorn. 1998. Special Problems with the Extraction of Plant. Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, edited by Richard J. P. Cannell., 4: 343-363.

Hooykaas, P.J. and Beijersbergen. 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens.* Ann. Rev. *Phytopath*., 32: 157-159.

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

Kamm, G.W. , P.B. Dilkes , K. Lowe , G. Hoerster and A.B. Larkins. 2002. Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Natl. Acad. Sci*., 18: 11975-11980.

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J. Medic. Plant Res.* , 3:1222-1239.

Kunik, T. , T. Tzfira , Y. Kapulnik , y. Gafni , C. Dingwall and V. Citovsky. 2001. Genetic transformation of Hela cells by *Agrobacterium.* Proc. *Natl. Acad. Sci*. U.S.A., 98: 1871-1876.

Mantell, S.H. , J. A. Matthews and R. A. Mckee. 1985. Principles of Plant Biotechnology: An Introduction to Genetic Engineering in Plants. First edition, Blackwell Scientific Publications, USA.

Meyer, A.D. , J. Tempe and P. Costantino. 2000. Hairy root: A molecular overview. *Plant Microbe Inter*., 5: 1-39.

Michael, M.O. ; V.A. Bapat and O. Schieder (1982). Protoplast culture of three legumes: *Arachis-hypogaca*, *Melilotusofficinalis*, *Trifolium-resupinatum*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd*., 106: 173-177.

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

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

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

Mulabagal, V. and H. S. Tsay. 2004. Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Intr. J. Appl. Sci. Engin*. 2: 29-48.

Ortuno, A. , R. Oncina , J.M. Botia and J.A. Del Rio. 1998. Distribution and changes of diosgenin during development of *Trigonella foenum-graecum* plants modulation by benzylaminopurine. *Food Chem*., 1: 51-54.

Petropoulos, G.A. 2002.Fenugreek-the genus *Trigonella*. First edition Taylor and Francis, London.UK..

Purohit, S. S. 2007. A Laboratory Manual of Plant Biotechnology. Second ed.. Agrobios, India.

Rech, E.L. , S.J. Ochatt , P.K. Chand , M. R. Davey , J.B. Mulligan and J.B. Power. 1988. Electroporation increases DNA synthesis in cultured plant protoplast. *BioTech*., 6: 1091-1093.

Sambrook, J. , E.F. Fritsch and J. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, A laboratory Manual. 2nd edition .Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sauvaire, Y. and J. C. Baccou. 1978. L'obtention de la diosgenine. Problemes de lhydrolyse acid des saponines. Lloydia, 41: 247-256. (Cited in Ortuno et. al., 1998).

Tepfer, D.A. and J. Tempe. 1981. Production of di-agropine par des vaccines formees sous I action *Agrobacterium rhizogenes. Acad. Sci. Paris. Ser*.III, 292:212-218.

CO-CULTIVATION OF CELL SUSPENSION-DERIVED FROM COTYLEDON NODE OF *Trigonella foenum-graecum* L. WITH Ri PLASMIDS UNDER ELECTRICAL SHOCK AND ISOLATION OF DIOSGENIN FROM GENITICALLY MODIFIED CALLUS.

M.M.Al-Mahdawe* **M.K.Al-Mallah**** **A.O.Al-Attrakchii*****

*Lecturer - College of Education - University of Diyala.
** Prof. - College of Education - University of Mosul.
***Prof. - College of Agriculture and Forestry -University of Mosul.

ABSTRACT

This study was carried out in a laboratory tissue culture and genetic applications in the Department of Life Sciences / College of Education / Univ. of Mosul , it aims to get the tissue *Trigonella foenum-graecum* L. genetically modified from Co-cultivation with cell suspensions Ri plasmids isolated from bacteria *Agrobacterium rhizogenes* under the influence of electric shock and Valuation the content of diosgenin. Co-cultivation results of the densities 28.0 , 37.0×10^4 cell/cm^3 of cell suspension derived from callus of cotyledon node of *Trigonella foenum-graecum* L. with 50 µL of Ri plasmids, isolated from *Agrobacterium rhizogenes* R1601.This mixture exposed to 200 or 250 volt./50 msec. shocks and embedded in agar drops indicate the formation of microcalli, Assessment of opine proved the separation of agropine spots. This is indicate that callus is genetically transformed. The data indicated the presence of diosgenin in these cultures when assessed by Infrared Ray (IR) spectrum and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) compared with standard samples. This genetically transformed callus have high content of diosgenin achieved 297.7%, that equaling twice of its quantity 161.8% present in leaves of fenugreek plants produced from seeds.

Key words: co-cultivation, cell suspension, *Trigonella foenum-graecum,* Ri plasmids, diosgenin.