Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X)

Formation of Genetically Transformed Hair Roots of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.,) Plants By Ri-Plasmid Vector of *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 Molecular

A. M. Ibrahim[(1)], A. A. Mohammed[(2)]

[(1,2)] Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

Article information

Article history:
Received: March 30, 2024
Revised: July 07, 2024
Accepted: July 16, 2024
Available online: September 01, 2024

Keywords:
Chamomile Plant
Genetic Transformation
Plasmid Vector Ri
PCR.

Correspondence:
Aala Moath Ibrahim
alaa.23scp147@student.uomosul.edu.iq

Abstract

This study succeeded in developing hairy roots from the hypocotyledonous stems of chamomile *Matricaria chamomilla* L. plant seedlings by Ri plasmid isolated from *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 using direct injection technology, and exceeding the concentration 1214.32 In encouraging the development of hair roots by 80% after7 day. After isolating the hair roots from their places of formation and placing them individually or as tufts on solid Murashige and Skoog (MS) medium, typical cultures were produced and required subcultured every 25 One day, the hair roots were characterized by being white, branched, and growing negative geotrpism. The results of electrophoresis on an agarose gel of the isolated polymerase chain reaction (PCR) product, which included the amplification of deoxyribonucleic acid (DNA), showed the appearance of a single band with a molecular size of 248 bp, which is similar to the molecular size of the specific primer of the *rol A* gene, and this is evidence of the success of the transformation. Genetic analysis by transferring T-DNA genes from plasmids and inserting them into the cell genome of seedlings of the chamomile plant.

DOI: 10.33899/edusj.2024.148175.1436, ©Authors, 2024, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. المقدمة

يقصد بالتحول الوراثي تضمين جين جديد داخل جينوم كائن حي اخر [1]، لإحداث تغاير مطلوب في صفاته الوراثية والبيولوجية. يعد التحول الوراثي استراتيجية مهمة لتعزيز الكتلة الحيوية النباتية أو المقاومة لاستجابةً للبيئات المعاكسة [2]. وهناك العديد من طرق التحول الوراثي في النبات أهمها أستخدام الاكروبكتريوم *Agrobacterium* [3] هي بكتريا سالبة لصبغة كرام, تعيش في التربة, عصوية الشكل, غير مكونة للسبورات, تمتلك اسواطاً ومتحركة, عضوية التغذية, تتروح درجة حرارة نموها المثلى بين 25-29 سيليزية PH من 6-8 [4]

وتعود بكتريا الاكروبكتريوم الى عائلة Rhizobiaceae والتي تضم نوعين مهمين في مجال التحول الوراثي، الاول هو *A. rhizogene* : المسؤول عن تكوين الجذور الشعرية hairy root لامتلاكها الناقل البلازميدي Ri (Root- indusing plasmid) والثاني *A. tumefaciens* والمسؤول عن تكوين [5] العقد التاجية Crown galls التي تكون بشكل اورام لوجود الناقل البلازميدي Ti (Tumor inducing plasmids) يحتوي الناقل البلازميدي Ri [6] منطقة Transffer –DNA (T-DNA) والتي تحوي جميع الجينات المسئولة عن احداث عملية التحول الوراثي للنباتات بانتقالها طبيعيا الى الخلية النباتية المجروحة واندماجها داخل جينومها ثم التعبير الجيني لها وظهور اعراض الاصابة بظهور الجذور الشعرية ;[8] [7] هذه العلمية تتنشط ببعض المواد الفينولية المفرزة مثل Acetosyirgone [9]. ويتميز التحول الوراثي بأستخدام بكتريا الاكروبكتريوم بسهولة أجرائها ونجاحها على أنواع مختلفة من النباتات كالبروكلي *Brassica oleracea* var italic [10], زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. [11], فول الصويا *Soy bean* [12], الفجل *Raphanus sativus* [13]. ونجحت الدراسة التي قام بها الباحثون في إحداث التحول الوراثي لنبات البابونج الالماني ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* , وأبدت الجذور الشعرية وكالسها المحولة وراثيا تفوقاً في تراكيز المركبات الثانوية المهمة للنباتات عن تلك غير المحولة [14].

يعود نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. الى العائلة النجمية Asteraceae [15], وهو نبات عشبي حولي أرتفاعه 50-60 سم, وتعود الاهمية الطبية لنبات البابونج إلى وجود بعض المركبات النشطة في أنسجته والتي لها تأثير معين على جسم الإنسان والحيوان، ويحوي زيته خصائص مضادة للالتهابات ،

مضادات للتشنج، مضادات للاكسدة، [16] أن الجزء الفعال من نبات الباونج هي الأزهار [17]. تهدف الدراسة الحالية الى إخضاع نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. لنظام التحول الوراثي بوساطة *A. rhizogenes* ATCC 15834 بطريقة التلقيح بالحقن المباشر باستخدام needle دقيقة (insulin syring) وإنتاج مزارع الجذور الشعرية والتأكد من نجاحه جزيئياً.

2. مواد العمل وطرائقه

إنتاج بادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. :

جهزت بذور البابونج *Matricaria chamomilla* L. من الاسواق المحلية لمدينة الموصل \العراق و عقمت سطحياً بغمرها في محلول الكحول الاثيلي 96%لمدة دقيقتين مع التحريك المستمر.ثم غمرت في 2% من محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري) لمده 5 دقائق .وغسلت بالماء المعقم ثلاث مرات \ دقيقة ووضعت على ورق الترشيح لغرض التجفيف . وضعت البذور في قنان سعه 100مل تحتوي 30مل من وسط MS الصلب بمعدل 4-5 بذور [14]. وغلقت فوهاتها بواسطة رقائق الالمنيوم ثم حفظت العينات في غرفة الزرع Culture room بظروف الظلام بدرجة حرارة 24 ± 2 سيليزية وبعد انبات البذور(ظهور الجذير والرويشة) الذي استغرق أربعة ايام نقلت الى ظروف التعاقب الضوئي 16 ساعه ضوء /8 ساعات ظلام اضاءة شدة 400 لوكس.

تحضير لقاح الناقل البكتيري *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 :

جهزت السلالة البكتيرية *Agrobacterum rhizogenes* ATCC 15834 من مختبر زراعة الانسجة النباتية في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل والمجهزة اساساً من (Prof.Dr.Jutta Ludwig-Mueller,Technical University Dresden,Germany) واخذت مستعمرة بكترية منفردة منها لقح منها 20 مل من الوسط (YEB) Yeast Extract Beef medium السائل ضمن قنان معقمة وحضنت العينات في الحاضنة الهزازة (New Brunswich Scientific So.,INC.Edison, N.G.USA) في الظلام في درجة 28 سيليزية وسرعة 130 دورة / دقيقة لمدة 24, 48, 72 ساعة كل منها في قنينة منفردة, نبذت كل منها باستخدام جهاز الطرد المركزي (Centrifuge,Labnet international,Inc.Glopal.USA) لمدة 15 دقيقة وسرعة 1500 دورة / دقيقة. أهمل الراشح واضيف حجم من وسط YEB السائل الى البكتريا المترسبة. واخذ 1.5 مل من كل مزرعة بكتيرية سائلة ومن الوسط السائل لتصفير الجهاز, ثم قيست الكثافة الضوية O.D عند الطول الموجي 600 نانو متر باستخدام المطياف الضوئي (Rad,USA Smartspece 300 Specrophotometer,Bio) لكل منهما وكانت كثافتهما في المليتر واحد (1.111 ،1.241، 0.952 خلية/ مل) على التوالي[18] واستخدمت هذه المزارع لاحقا في عملية عزل البلازميدات .حيث تم عزل بلازميدات pRi-DNA من السلالة البكتيرية *A. rhizogenes* ATCC15834 بأُخذ 1.5 مل من المزارع البكتيرية *A. rhizogenes* ATCC15834 السائلة والتي تم تحضينها مُسبقاً للفترات 72,48,24 ساعة وَوُضِعَتْ بصورة منفردة في أُنبوبة ابندروف وأجريت خطوات عزل البلازميد بالاعتماد على الطريقة المتبعة من قبل [19]. تم الكشف عن تراكيزه بواسطة جهاز النانودروب (Spectrophotometer, Bio drop, England) بطول موجي 206-280 نانومتر [20] والتي كانت 1159.24, 1214.32, 1113.12 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ على التوالي. ومن ثم حفظ البلازميد في ظروف 4 درجة سيليزية لحين الأستعمال.

تلقيح قطع السيقان تحت الفلقية للبابونج

أخذت بادرات البابونج النامية وقطع سيقانها25 يوم بطول 1.5 سم تقريبا ولقحت بالحقن المباشر باستخدام needle دقيقة (insulin syring) التي سبق وان غمرت قمتها بالمعلق البلازميدي , ووخزت قطع السيقان عند النهايات العليا وجوانبها. ولقحت عينات المقارنة بالماء المقطر المعقم ثم غمرت قواعدها بشكل قائم داخل وسط MS الصلب وحضنت جميع العينات في حاضنة النمو تحت ظروف اضاءة خفيفة 400 لوكس وبدرجة حرارة 24 ± 2 سيليزية.

انتاج مزارع الجذور الشعرية :

أستؤصلت الجذور الشعرية المتكونة في مواقع التلقيح ونقلت منفردة او بشكل خصل بطول 3-4 سم وَوُضِعَتْ في أطباق بتري تحوي 20 مل من وسط MSO الصلب. ثم وضعت في غرفة الزرع وبنفس الظروف السابقة.

اثبات التحول الوراثي بدلالة التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR) :

تضمنت استخلاص الحمض DNA من انسجة الجذور الشعرية المتوقع تحولها الوراثي بواسطة الناقل البلازميدي Ri المعزول ذات التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ اتبعها قياس تركيزه ونقاوته باستخدام جهاز النانودروب ومن ثم الترحيل الكهربائي للعينات في الاكاروز (1% Agarose, LE,Analytical Grade, promega, USA) وحاوي على صبغة (safe Gel stain Dye, Add bio,Korea) وبظروف تيار كهربائي ذي فرق جهد 80 فولت لمدة ساعة .اتبعها تصوير الهلامة بجهاز Geldo cumetation (Gel Doc EZ Imager, Bio Rad,USA) لرؤية الحزم المفصولة ,وضخم DNA بواسطة التفاعل التسلسلي البوليميرازي باستخدام البادئ المتخصص للجين *rol* A ذي الحجم الجزيئي bp248 وذي التتابع: F=5-CGTTGTCGAATGGCCCAGACC-3، R=5- CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC-3. بأعتماد البروتوكول المتبع [21] والمتكونة من ثلاث مراحل: **الاولى**: المسخ عند درجة حرارة 95 ° سيليزية لمدة 15 دقيقة، **الثانية:** 35 دورة رئيسية لكل منها ثلاث مراحل ثانوية (الاولى:المسخ عند 95 ° سيليزية لمدة دقيقة واحدة ، الثانية :الارتباط عند 55 ° سليزية لمدة دقيقة والثالثة: الامتداد عند 72 ° سيليزية لمدة دقيقة واحدة)، **الثالثة**: الرئيسة هي الاستطالة النهائي عند 72 ° سيليزية لمدة 15 دقيقة. ومن ثم اتباع الخطوات السابقة من الترحيل الكهربائي والتصوير.

3. النتائج والمناقشة

انتاج البادرات المعقمة :

أبدت طريقة التعقيم السطحي لبذور البابونج نجاحها بدلالة الحصول على بذور معقمة بنسبة انبات وصلت 90% منتجة بادرات سليمة خالية من الملوثات عند زراعتها في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو. وغالبا ما تقاس كفاءة تعقيم البذور من عدم تلوثها بعد زراعتها على الوسط الغذائي وانباتها بادرات ذات حيوية جيدة لاستخدامها لاحقا [22].

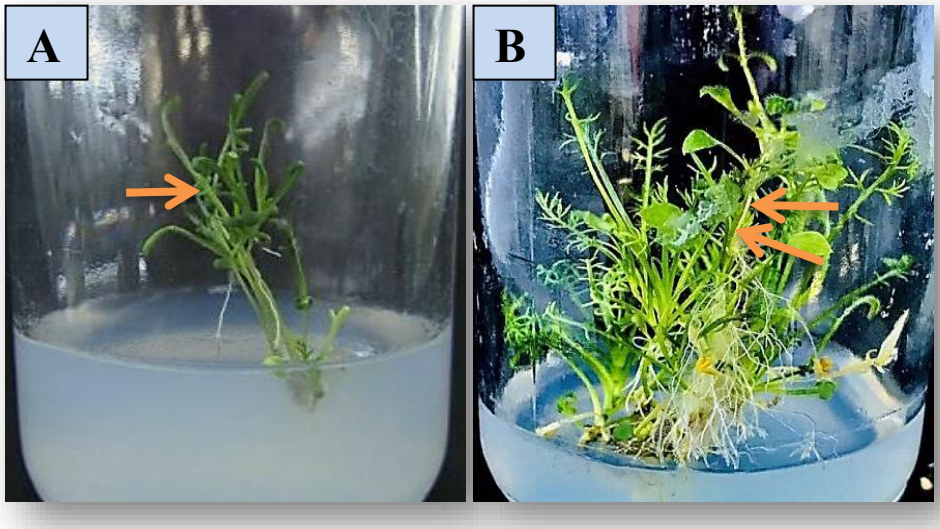
نشوء أستحداث الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات البابونج *Matricaria* chamomilla L. الملقحة بالناقل البلازميدي pRi

أظهرت النتائج كفاءة الناقل البلازميدي Ri المعزول من بكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 في تشجيع تكوين الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية عند حقنها المباشر وبنسب متباينة بالاعتماد على اختلاف تراكيز البلازميد المستخدم (الجدول، 1).

الجدول(1): نشوء أستحثاث الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية المفصولة من بادرات البابونج *Matricaria chamomilla* L. الملقحة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا*A.rhizogenes* ATCC15834 بعد 28 يوم

تركيز الناقل البلازميدي Ri (نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$)	اعداد قطع السيقان الفلقية الملقحة/ المستجيبة	تكوين الجذور الشعرية (%)	عدد الجذور الشعرية/ قطعة	فترة تكوين الجذور الشعرية (يوم)
1214.32	**72\90**	**80**	**18**	**7**
1159.24	45\90	50	12	20
1043.12	32\90	35.55	5	28
D.W (المقارنة)	0\40	0	0	0

وتظهر بيانات الجدول أعلاه تفوق التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ في استحداث الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية للبادرات بنسبة 80% بعد 7 أيام من التلقيح بدأت بظهور بروزات بيضاء صغيرة في أماكن التلقيح ثم بزوغ الجذور الشعرية (الشكل،1-A) والتي تطورت لاحقاً بالنمو والتفرعات وبشكل كبير رافقها تكوين أفرع خضرية
(الشكل، 1-B) بأعداد بلغت معدلها لكل قطعة ساق ملقحة 11 وبطول 3.2 سم بعد 25 يوم من التلقيح. ثم يليه تراكيز الناقل البلازميدي 1159.24 و 1043.12 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ في تحفيز للجذور الشعرية وصلت 50% , 48% على التوالي.



الشكل(1): نشوء الجذور الشعرية من سيقان وأوراق التحت الفلقية لبادرات نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. الملقحة بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا *A.rhizogenes* ATCC15834 بتركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر^{1}.

A- استحداث الجذور الشعرية بعد 7 أيام من التلقيح.
B- تطور الجذور الشعرية بكثافة وظهور الافرع الخضرية بعد 25 يوم من التلقيح.

ويعود نجاح التحول الوراثي في النبات الى نجاح انتقال البلازميدات وتحمل أنسجة نبات البابونج لعملية التلقيح [23], وبعد ظهور الجذور الشعرية اولى علامات التحول الوراثي وبدورها تشير الى نجاح انتقال جينات T-DNA من الناقل البلازميدي لبكتريا الاكروبكتريوم الى الخلية النباتية ومن ثم تضمينه داخل جينومها ونجاح التعبير الجيني الى مظاهر المرض النباتي وهو الجذور البيضاء .وعادة تبدأ مراحل مهاجمة بكتريا *A. rhizogenes* للخلايا النباتية المجروحة والأخيرة تفرز مركب الأسيتوسيرنجون Acetosyringone وبعض الجزيئات السكرية التي تعمل على تنشيط تشفير مجموعة جينات *vir* إلى بروتينات متعددة تكون لها المسؤولية عن خطوات التحول الوراثي , إذ تتبنى فصل جزئية T-DNA من بلازميدات Ri وانتقالها إلى الخلايا النباتية ومن ثم تضمينها داخل جينومها [9] [3].

ويُعد احداث الجرح في الخلايا النباتية مفتاحاً للبدء بعملية التحول الوراثي، وتعتبر طريقة الحقن المباشر احد طرقها المتبعة مختبرياً والتي أثبتت نجاحها في التحول الوراثي مع اغلب الانواع النباتية ومنها البنجر السكري[24]، الجزر[25]، اللهانة [25]، البروكلي [26]. ان الاختلال الهرموني الذي تسببه الجينات المحمولة على جزيئة T-DNA والتي من المرجح ان يستمر تعبيرها الجيني ربما هي السبب في تكوين الافرع الخضرية من اماكن التلقيح وكذلك الى التعبير للجينات المسؤولة عن بناء السايتوكاينينات *tmr* [28][27].

إنتاج مزارع الجذور الشعرية :

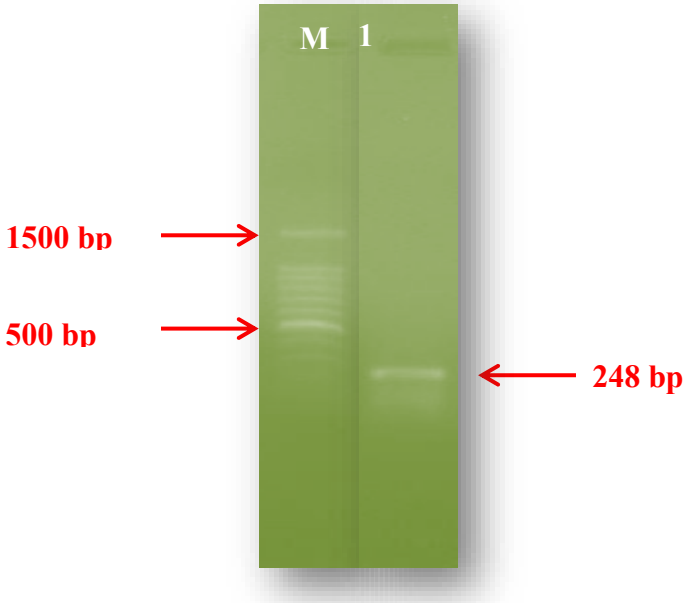
نجحت الجذور الشعرية المتكونة على قطع السيقان تحت الفلقية نتيجة تلقيحها بتركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ من بلازميدات Ri عند استئصالها ووضعها منفردة او بهيئة خصل على سطح وسط MS الصلب في استمرار نموها وزيادة تفرعاتها وسلبيتها للانتحاء الارضي وتكوينها مزارع من الجذور الشعرية والتي تطلبت اعادة زراعتها كل 25 يوماً.

الشكل(2): انتاج مزارع الجذور الشعرية المفصولة من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات البابونج .Matricaria chamomilla L الملقحة بتركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$ بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا A.rhizogenes ATCC15834 بعد 25 يوم.

ان استمرار نمو الجذور الشعرية المحولة وراثياً بعد وضعها على وسط MS الصلب قد يُعزى الى طول اجزائها المرستيمية وزيادة معدلات انقسامها [29]. او الى الاختلاف في مجاميع الخلايا المصابة والاعداد المستجيبة ومدى التداخل الناجح بين الجزء النباتي وتوافقها مع تركيز اللقاح البلازميدي [30].

الدليل الجزيئي لنجاح التحول الوراثي للجذور الشعرية الناتجة بالناقل البلازميدي Ri:

تشير النتائج إلى أن تركيز الحمض النووي الكروموسومي المستخلص من الجذور الشعرية بلغ 423 وبنقاوة 1.7, واثبت صورة الترحيل الكهربائي لناتج PCR ظهور حزمة واحدة (الشكل، 3) بلغ حجمها الجزيئي 248pb وهو مماثل للحجم الجزيئي للبادئ المستخدم لجين *rol A* وهذا يعد دليلاً على نجاح التحول الوراثي بفعل انتقال الجين من البكتريا الى أنسجة البابونج ونجاح التعبير الجيني لها مما أدى إلى ظهور الجذور الشعرية وإحداث تقلبات المتمثل بزيادة نموها وانتاج الافرع الخضرية [31]. إنَّ إعتماد إختيارPCR على مستوى الجينات وتواجدها في جينوم النبات يعطي دلالة جُزيئية على تواجدها. وهذا وجد في عدد من النباتات ومنها الجزر [25]، البروكلي [10] ، الحلبة [32]، الفجل [13].



الشكل(3): الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التسلسلي البليميرازي للحمض النووي الضخم والمعزول من الجذور الشعرية المحولة وراثيا لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. ببلازميدات Ri لبكتريا *A. rhizogenes* ATCC15834 في هلام الاكاروز 1%

الاستنتاجات

- نجاح تضمين جينات T-DNA في جينوم خلايا نبات البابونج بأستخدام الحقن المباشر لبلازميدات Ri بدلا من البكتريا الكاملة
- الحصول على الجذور الشعرية محولة وراثياً دليل نجاح التحول الوراثي واثباتها جزيئياً بأستخدام PCR
- وفر استخدام البلازميدات المعزولة ذاتها لاحداث التحول الوراثي غياب التلوث في المزارع النسيجية
- أحتفاظ الجذور الشعرية بجينات rol

شكر وتقدير

يتقدم الباحثون بالشكر والأمتنان لجامعة الموصل\ كلية العلوم على التسهيلات المتوفرة والتي ساعدت على أنجاز هذا البحث.

References

[1] Wilson, R.H.C. and Coverley, D "Transformation-induced changes in the DNA-nuclear matrix interface, revealed by high-throughput analysis of DNA halos". Sci. Repts., 7 (1): 1-7, 2017.

[2] Varasteh-Shams, M.; Nazarian-firouzabadi, F. and Ismaili A. "The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones". Curr. Plant Biol., 24: 100177 ,2020 .

[3] Keshavareddy, G. ; Kumar, A.R.V. and Ramu, V.S.." Methods of Plant transformation- A review". Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 7(7): 2656-2668,2018.

[4] Flores-Félix, J. D. ; Menéndez, E.; Peix, A. ; García-Fraile, P. and Velázquez, E.." History and current taxonomic status of genus Agrobacterium. Systematic and Appl". Microbiol., 43(1): 126046, 2020.

[5] Lee, S.Y. ; Kim, S.G ; Song, W.S. ; Kim, Y.K. ; Park, N. I. and Park, S.." Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alixarin and purpurin in Rubia okana nakai". Roman. Biotech. Lett., 15: 5405-5409, 2010.

[6] Gohlke, J. and Deeken, R.." Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development", Frontiers in Plant Sci., 5: 155, 2014.

[7] Niazian, M; Belzile, F; and Torkamaneh, D.. "CRISPR/Cas9 in Planta Hairy Root Transformation: A Powerful Platform for functional analysis of root traits in soybean". Plants., 11(8), 1044, 2022.

[8] Bahari, Z. ; Sazegari, S. ; Niazi, A. and Afsharifar, A. ,"The application of an Agrobacterium-mediated in planta transformation system in a *Catharanthus roseus* medicinal plant. Czech J. Genet. Plant.Breed,. 56(1): 34-41 BMC Plant Biology 23 (1), 659, 2020.

[9] Gelvin, S.B." Agrobacterium in the genomics age", Plant Physiol., 50: 1665-1676, 2009.

[10] AL-Hadidy, S.J.S. ,"Genetic transformation of broccoli plant with via Ri plasmids isolated from two strains of Agrobacterium rhizogenes and its Reflection in sulforaphane compound levels" , MSc. Thesis/ Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul/ Iraq, 2020.
[11] AL-Sinjiri ,A.M.H.," Efficiency the Helianthus annus plant tissues which genetically transformed with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 in phytoremediation.M.Sc", thesis, Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul, 2022.
[12] Fan, Y. L. ; Zhang, X. H. ; Zhong, L. J. ; Wang, X. Y. ; Jin, L. S. and Lyu, S. H. ,"One-step generation of composite soybean plants with transgenic roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation", BMC plant Biol., 20(1): 1-11, 2020.
[13] Mohammed, A.A., "Efficiency the hairy roots of radish (*Raphanus sativus*) plant which genetic transformed by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 for anthocyanin production. Eurasia", J. Biosci., 14: 6437-6441, 2020.
[14] Yuling, T. ; Jie, Z. ; Youhui, C. ; Yi, Y. ; Honggang, W. ; Luyao, Y. ; Shuangshuang, L. ; Lu, Y. and Yifan, J. ,"Establishment and validation of a callus tissue transformation system for German chamomile (Matricaria chamomilla L.)" BMC Plant Biol 23, 659. https://doi.org/10.1186/s12870-023-04680-3, 2023.
[15] Shams, A.; Abadian, H.; Akbari, G.; Koliai, A.; Zeinali, H. ,"Effect of organic and chemical fertilizers on Amount of Essence, biological yield and harvest index of *Matricaria chamomile*". Ann. Biol. Res., 3(8): 3856- 3860, 2012.
[16] Riona Kimura, Jonathan Schwartz and Elliott Bennett9 ,"Guerrero Journal Herbal Medicine", 100714, 2023.
[17] Astin, J.A; Pelletier, K.R. ; Marie, A. and Haskell, W.L., "Complementary and Alternative medicine use among elderly persons: One year analysis of Blue Shield medicare supplement", J. Gerontol., 55:M4–M9, 2000 .
[18] Atlas, R. M.; Brown, A. E. and Parks, L. C. , "Laboratory Manual, Experimental Microbiology". Mosby-Year Book, Inc, USA, 1995.
[19] Sambrook, J.; Fritschi, E.F. and Maniatis, T.," Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA,1989.
[20] Dhahi, S.J. ; Al-Assie, A.H. and Omear, H.A.," 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): 1-16, 2011.
[21] Rahimi, K.; Haghbeen, K.; Marefatjo, J.; Jazii, F.R. and Sheikhani, R.," Successful production of hairy root of Valeriana sisymbriifolium by *Agrobacterium rhizogenes*" Biotech., 7(2): 200-204, 2008.
[22] Sen, M. K.; Jamal, M. A. H. and Nasrin, S. "Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured *in vitro*", Environmental and Experimental Biology, 11, 119-123,2013.
[23] Clement, W.K.F.; Lai, K.S.; Wong, M.Y. and Maziah, M. ,"Heat and hydrolytic enzymes treatment improved the *Agrobacterium*-mediated transformation of recalcitrant indica rice (Oryza sativa L.)" Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 125(1): 183–190,2016.
[24] Al-Mallah, M. K. and Al-Nema, Q. S. ,"Putative genetically modified callus derived from transformed hairy roots induced on sugarbeet (*Beta vulgaris*) explants by *Agrobacterium rhizogenes* 1601 harbouring Riplasmid", Iraqi J. Biotech., 11(2), 4, 2016.
[25] Al-Mallah and M K and Amjad Abdel Hadi ,"A new method for genetic exploration of marine plants using the vector *Agrobacterium rhizogenes* R1601". Patent No.: 5641, Central Organization for Quality Standardization, Baghdad, Iraq, 2019.
[26] Sultan, S. J. and Mohammed, A. A. "Genetic transformation of broccoli (Brassica oleracea Var. italica) plant by plasmids of *A. rhizogenes* R1601 and their molecular detection". Biochem. Cell. Arch., Accepted, 2020.
[27] Faiss, M.; Zalubìlová, J.; Strnad, M. and Schmülling, T. "Conditional transgenic expression of the ipt gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants" The Plant J., 12(2), 401-415, 1997.
[28] Jordi, W.; Schapendonk, A. H.; Davelaar, E.; Stoopen, G. M.; Pot, C. S.; De Visser, R. and Amasino, R. M. "Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12–IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning", Plant, Cell and Environment, 23(3), 279-289, 2000.
[29] Meyer, A.D.; Tempé, J. and Costantino, P. "Hairy root: A molecular overview". Plant Microbe Inter., 5: 1-39, 2000.
[30] Hu, Z.B and Du, M. "Hairy root and its application in plant genetic engineering". J. Integrative Plant Biol.,48, 121–127, 2006.
[31] Ткаченко, А. А.; Додуева, И. Е.; Творогова, В. Е.; Предеус, А. В.; Правдина, О. Ю.; Кузнецова, К. А. and Лутова, Л. А. "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (Plant Gen2021): The 6th International Scientific Conference (June 14–18, 2021, Novosibirsk, Russia); In Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: The 6th International Scientific Conference, 2021.
[32] Mohammed, A. A. ; Masyab, H. M. "Genetic transformation of *Nigella sativa* L. plants with *Agrobacterium rhizogenes* 35S *GUS* R1000 and estimation of Thymoquinone level in transformed hairy roots cultures". Plant Archives, 20 (Supplement 1): 3649-3652, 2020.

التحول الوراثي لنبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بالناقل البلازميدي Ri لبكتريا *Agrobacterum rhizogenes* ATCC 15834 والتحري عنه جزيئيا

الاء معاذ ابراهيم يونس[1] ، امجد عبد الهادي محمد[2]

[1،2] قسم علوم الحياة, كلية العلوم, جامعة الموصل, العراق

الخلاصة

نجحت هذه الدراسة في استحثاث الجذور الشعرية من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات البابونج *Matricaria chamomilla* L. بالناقل البلازميدي Ri المعزول من *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 (طرق) بتقانة الحقن المباشر، وتفوق التركيز 1214.32 نانوغرام مايكروليتر [1] في تشجيعه استحداث الجذور الشعرية بنسبة 80% بعد 7 ايام. وبعد فصل الجذور الشعرية من اماكن تكوينها ووضعها منفردة أو بهيئة خصل على وسط Murashige and Skoog (MS) الصلب انتجت مزارع نموذجية وتطلبت اعادة زراعتها كل 25 يوماً وتميزت الجذور الشعرية بأنها بيضاء اللون متفرعة وتنمو ضد الجاذبية الارضية. أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز لناتج التفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase chain reaction (PCR) المتضمنة تضخيم الحمض النووي الكروموسومي Deoxyribonucleic acid (DNA) المعزولة ظهور حزمة مفردة حجمها 248 bp وهو يماثل حجم للبادئ المتخصص لجين *rol* A، وهذا يعد دليل نجاح التحول الوراثي عن طريق نقل جينات T-DNA من البلازميدات وادخالها في جينوم الخلايا لبادرات نبات البابونج*Matricaria chamomilla* L .