جامعة الفيوم **كلية الزراعة**

مقاومة انشطار القرون فى الكانولا (*Brassica napus*)

باستخدام النقل الجينى

رسالة مقدمة من

جهاد ربيع عبد الجواد عيد

بكالوريوس العلوم الزراعية (أمراض النبات) - جامعة الفيوم ٢٠١٢

كجزء من متطلبات الحصول على

درجة الماجستيرفي العلوم الزراعية

بيوتكنولوجى

قسم الوراثة

كلية الزراعة- جامعة الفيوم

2018

الملخص العربى

يمثل فرط البذور أو انشطار القرون بعد النضج مشكلة رئيسية في إنتاج الكانولا في جميع أنحاء العالم، ويمكن أن يؤدي هذا إلى خسارة تصل إلى ٥٠٪ من العائد إذا تأخر الحصاد. وفي الفتره الاخيره اتجه بعض الباحثين الي استخدام تقنيات الهندسه الوراثيه كمنهج واعد بديل لنقل صفه مقاومه الانشطار للتغلب علي المشكلات التي تواجه التهجين النوعي.

أجريتهذه الدراسة بقسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم، خلال الفترة من ٢٠١٦ - ٢٠١٨ م.

وفي هذه الدراسة تم استخدام سلالتين649105 PI و(271442 PI من النوع *Brassica juncea*كمصدر لجينات مقاومة انشطار القرونوكذلكتم استخدام الصنف Serw 4 من النوع *Brassica napus* L.كمصدر للأجزاء النباتيةلاجراء التحول الجيني للكانولابواسطة الأجروباكتيريم.

وتم استخلاص الحمض النووي(DNA) من نباتات كل من *B.juncea* و *B.napus*. ثم استخدام البادئات الخاصة بجينات1 *SHAT* و 2 *SHAT* و 3 *SHAT* و 2 *FUL* و *FUL* 3المقاومة لانشطار القرون فى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للحصول على هذه الجينات. وبعد الحصول على تتابعات نواتج ال PCR استخدمت برامج BLASTN 2.2.18 و ExPASy (Translate Tool) وBLASTP وLocTree3لتحديد تتابع البروتين والتنبؤ بوظيفته.

واستخدمت بكتيريا*E. coli*السلالات(DH5α, JM 109 and TOP10)في جميع التجارب البيولوجية الجزيئية و بكتيريا*A.tumefaciens* السلالة LBA4404 لنقل الجينات وتحول النبات. وكذلك استخدم بلازميد RBC T&A Vector لكلونة نواتج ال PCR. والناقلات النباتية الثنائية pCAMBIA1301 لاجراء التحول الوراثى لنبات *B.napus*باستخدام الصنف4 Serwكمصدر للأجزاء النباتية مثل ، cotyledon .petiolshypocotyls,cotyledons,

ويمكن تلخيص أهم النتائج المتحصل عليها فى الآتى:

تحليلات ال PCR

١. عدم ظهور أى حزم عند استخدام أزواج البادئات الخمسة (FU 1, FU 2, FU 3, Ful 2 and Ful 3)فى تضخيم جزء معين من جينات 1-3 *SHAT* و*FUL2*&3لجينوم *B.napus*الصنف 4 Serw.
٢. عدم ظهور أى حزم عند استخدام اثنان من أزواج البادئات في تضخيم جزء معين من جينات 1 *SHAT* و 3*FUL*لجينوم*B.juncea*.
٣. أظهرت ثلاثة من أزواج البادئات (Ful 2, Fu3, Fu2) حزمة واحدة ذات وزن جزيئى ٧٥٠، ٩٠٠و ١٢٠٠ زوج قواعد على التوالى فى كل من سلالاتين الجينوم*B.juncea* .

١. تم اضافة عديد النيوكليتيدة A لكل نواتج ال PCR لكلونتها مع البلازميد RBC T&A cloning vector ونتج من ذلك بلازميدات مطعمة - RBC- *SHAT* 2, - *SHAT* 3 or *FUL* 2.
٢. تم اجراء التحول الوراثى لبكتيريا ال *E. coli* باستخدام هذه البلازميدات وانتخاب الخلايا المتحولة على بيئة مضاف لها امبيسيللين (١٠٠ميكروحرام/مل).
٣. تم الحصول على البلازميدات المشيدة و تتابع النيوكليوتيدات للجينات *SHAT* 2 و *FUL* 2 ولم نحصل على تتابع النيوكليوتيدات للجين *SHAT* 3.
٤. أظهرت نتائج تحليل الكمبيوتر باستخدام برنامج BLASTN

- نسبة تشابه ١٠٠٪ بينتتابع النيوكليوتيدات للجينات المتحصل عليها من سلالات ال *B. juncea*.
- وكذلك نسبة تشابه ٩٨٪ بين الجين الناتج من الـ *B.juncea* باستخدام زوج البادئات FU2مع *B.rapa* subsp. pekinensis والموجودة بالبنك الدولى للجينات.
- وكذلك نسبة تشابه ٩٧٪ بين الجين الناتج من الـ *B.juncea* باستخدام زوج البادئات Ful2مع *B.rapa* والموجودة بالبنك الدولى للجينات.
- اظهرت شجرة القرابة للجين *SHAT* 2 وجوده منفردا عن *B.rapa* subsp. Pekinensis.

٥. أظهرت نتائج الترجمة للجين *SHAT* 2باستخدام برنامج EXPASY٦ اطر تحتوى علىOpen Reading Frame للبروتين الناتج من هذا التتابع.
٦. تم اختيار أحدالإطر والمحتوى على Open Reading Frameواحد لتحليله باستخدام برنامج ال PLASTP

- وأظهر ذلك تشابه هذا البروتين بنسبة ٩٤% مع بروتينات En/Spm- related transposon protein (ACG60686).
- وكذلك أظهرت شجرة القرابة ارتباط وثيق لهذا البروتين مع ACG60686.
- وللتنبؤ بوظيفة منتج الجين، وتبين تطابقه مع المنطقة خارج الخلوية GO0005576.

استنساخ الجينات وتحول بكتيريا الAgrobacterium:

١. تم الحصول على الجين*SHAT* 2-Hind III / Bam HI باستخدام ال PCR ودمجهفى البلازميد pCAMBIA 1301والذى تم تقطيعه بانزيمات القطع المتخصصة (Hind III/Bam H1)وتم الحصول على البلازميد المشيد *SHAT*2-pCAMBIA 1301.
٢. تم الحصول على خلايا*A.tumefaciens*متحولةبالبلازميد المشيد-pCAMBIA1301 *SHAT* 2 بعد انتخابها على بيئة محتوية على كاناميسين وريفامبسين.

التحول الجيني لنباتات الكانولا*Brassica napus*

١. تم استخدام الاجزاء النباتية Cotyledon, hypocotyl and cotyledon petiol فى نقل الجين باستخدام بكتيريا الاجروباكتيريم الحاملة للبلازميد المشيد -pCAMBIA 1301 *SHAT* 2.

٢. تم اختبار النباتات المتحولة على بيئة زراعة نباتيةMS التي تحتوي على المضاد الحيوى كانامايسين وأظهرت النتائج تحمل النباتات للمضاد الحيوى.
٣. أظهرت النتائجنقل الجين الىhypocotyl من الصنف Serw 4لجينوم *B.napus* باستخدام بكتيريا الاجروباكتيريم المتحولة وذلك بالحصول على عدد كبير من النبيتات المتولدة (plantlets).
٤. وتم التأكد من نقل الجين فى النباتات المتولدة عن طريق الكشف عن جين *SHAT* 2 باستخدام تحليل PCR. وأظهرت النتائج ظهور الحزمة الخاصة بهذا الجين.

التوصيات

١. تماكتشاف منتج جيني جديد ولكن نحتاج الى مزيد من البحث للكشف عن وظيفة هذا البروتين خارج الخلوى.
٢. يجب الحفاظ على البلازميدات المشيدةمن النوع pCAMBIA-*SHAT* 2.
٣. استخدامالAgrobacterium كان ناجحا فى نقل هذا الجين.
٤. وفى المستقبل سوف يتم دراسة تعبير تلك الجينات فى النباتات المتحولة للتأكد من ثبات صفة مقاومة انشطار القرون.