الفعالية النوعية لأنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين في مستخلصات الجذور الشعرية في السمسم المحَولة وراثيا بلستخدام سلالتين من *Agrobacteruim rhizogenes*

Specific activity of thymidine nucleotide biosynthetic enzymes in hairy roots extracts of *Sesamum indicum* L. transformed by two strains of *Agrobacteruim rhizogenes*

نهال عزت الطائي ساجدة عزيز عبود مزاحم قاسم الملاح*

كلية العلوم / جامعة الموصل

كلية التربية / جامعة الموصل*

Nihal E. Al- Taee Sajida A. Abood Mozahim K. Al-Mallah*

College of Science/ University of Mosul

* College of Education/ University of Mosul

المستخلص

تضمنت الدراسة استحثاث الجذور الشعرية المحَولة وراثيا من الأوراق والبادرات المزالة مجاميعها الجذرية المعقمة للسمسم *Sesamum indicum* L. باستعمال السلالتين R15834, R1601 من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* باعتبارها نواقل لإحداث التحول الوراثي. شجعت السلالة R1601 نشوء هذه الجذور على الاوراق والبادرات خلال 20 يوما من تلقيحها ونموها على وسط ارنون وهوكلاند الصلب , في حين أستلزم ظهورها على الاوراق والبادرات عند تلقيحها بالسلالة R15834 (12) يوما . وعموما فأن السلالة R15834 كانت الاكفأ في استحثاث الجذور الشعرية واعدادها المتكونة قياسا بالسلالة R1601 وسجلت نسبة تكوينها 54.4% و 41.6% على التوالي . وأظهرت البيانات عن زيادة واضحة في الفعالية النوعية لإنزيمات الثايميدليت سنثيز (TS)الداي هيدروفوليت ريدكتيز (DHFR) والسيرين هيدروكسي ميثايل ترانسفريز(SHMT) في مستخلصات الجذور الشعرية المنتجة للاكروبين بوساطة السلالة R15834 مسجلة 4.610 و1.057 و0.480 مايكرومول/ دقيقة/ملغم بروتين على التوالي قياسا بفعاليتها 1.256 و0.097 و0.125 مايكرومول/ دقيقة/ملغم بروتين في عينات المقارنة. وقد رافقها زيادة في كمية الاحماض النووية DNA و RNA وبلغت 105 و1020 مايكروغرام/غرام على التوالي قياساً بنظيراتها البالغة 44 و462 مايكروغرام /غرام في عينات المقارنة. واستدل على التحول الوراثي لهذه الجذور من انفصال الاكروبين من الجذور الشعرية لهاتين السلالتين عند ترحيل مستخلصاتها بوجود الاكروبين القياسي.

الكلمات المفتاحية: المحَولة، نيوكليوتيد الثايمين، نبات السمسم

Abstract

The study concluded induction of transformed hairy roots from leaves and decapitated seedlings of *Sesamum indicum* L. using two strains of *Agrobacterium rhizogenes* considered as natural vector of transformation. The strain R1601 stimulated roots on leaves and seedlings during 20 days of inoculation placed on solidified Arnon and Hoagland medium. Whereas they involved 12 days when inoculated with the strain R15834. Generally strain R15834 was efficient in inducing these roots and their numbers than strain R1601 which approached 54.4% and 41.6% respectively. The results indicated an increase in the specific activity of enzymes Thymidlate synthase (TS), Dihydrofolate reductase (DHFR), Serine hydroxy methyl transfrase (SHMT) in extract of transformed hairy roots producing agropine by stain R15834 and approach 4.610, 1.057, 0.480 µmol\min\ mg of protein respectively compared with the activity of 1.256, 0.097, 0.125µ mol\min\ mg in the control samples. This was coupled with an increase in amount of DNA and RNA that approached 105, 1020 µg per gram respectively compared to 44, 462 µg per gram in control samples. The transformation of these hairy roots was pointed out through the separation of agropine spots from their extracts when electrophoreted in the presence of standared agropine.

Key words: Transformation, thymidine nucleotide biosynthetic enzymes, *Sesamum indicum* L.

المقدمة

تحتوي خلايا الكائنات الحية عموما نوعين من الأحماض النووية هما DNA و RNA والوحدات الأساسية لبنائهما هي النيوكليوتيدات, وان البناء الحيوي للنيوكليوتيدات يمثل الحدث الرئيس في الخلايا لأنها المصدر المباشر للأحماض النووية ويبنى نيوكليوتيد الثايمين (أهم نيوكليوتيدات DNA) , في المسار الحقيقي متضمناً تحويل dUMP إلى dTMP بوجود إنزيم الثايميدليت سنثيز(TS) بإزاحة الهيدروجين المرتبط بذرة الكربون رقم 5 لليوراسيل في dUMP وإحلال مجموعة مثيل بدلاً عنها من مساعد الإنزيم المشتق من حامض الفولك N^5-N^{10}- methylene tetrahydrofolate . وأثناء التفاعل فإن وحدة الكربون تعاني اختزالاً لتصل إلى مستوى

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الاول

اكسدة مجموعة المثيل، وتشير الدراسات أن THF يكون مصدراً للمثيل والهيدروجين مكوناً 5,1 methylene THF [1]، ويمكن أن يتكون THF ثانية من DHF خلال فعالية إنزيم الداي هيدروفوليت ريدكتيز(DHFR) بوجود العامل المختزل NADPH [2], وأيضا يشارك THF في تفاعل ثالث بوساطة تفاعله مع السيرين لتكوين 5,10 methylene THF المحفز بأنزيم السيرين هيدروكسي ميثايل ترانسفريز(SHMT) وتساهم هذه الانزيمات الثلاثة في بناء نيوكليوتيد الثايمين في مسار تسمى دورة اضافة المثيل [3]. تؤدي عملية ادخال جينات أو قطعة من الحامض DNA في خلايا حية تحوير في التركيب الوراثي وهذا يعني بالتحول الوراثي Genetic Transformation بهدف تحسين النوع النباتي وعدم الإضرار بخصائصه وصفاته المكتسبة والوصول إلى كائنات محورة وراثيا Genetically modified organisms (GMOs). ويعد نظام التحول الوراثي ببكتريا *Agrobacterium* أو بلازميداتها بوصفها ناقلا طبيعيا من تقانات الهندسة الوراثية الناجحة والمباشرة في نقل الجينات المرغوبة إلى الخلايا النباتية [4]. ان بكتريا *A. rhizogenes* تصيب بنجاح مع عدد كبير من نباتات ذوات الفلقتين عن طريق الجروح التي تحرر مركبات فينولية كالاسيتوسيرنجون التي تجذب البكتريا إلى موقع الجروح جذبا كيميائيا [5] وحال دخولها تمنح قطعة t- DNA المحمول على بلازميد Ri إلى خلايا النبات واندماجها في جينوم هذه الخلايا محفزة تكوين الجذور الشعرية في موقع الإصابة اذ يمكن تلقيح النبات كاملاً بحقنه المباشر بالبكتريا كبادرات فستق الحقل *Lupinus mutabilis* [6] او يمكن تلقيح الجذور الخازنة للجزر أو باستخدام الزراعة المرافقة Co-cultivation[7]. ويعتبر نقل الجينات من مصادر أخرى الى نباتات السمسم بأساليب الهندسة الوراثية هو الخيار الوحيد لتطويرها كونها من النباتات صعبة التمايز خارج الجسم الحي بسبب محتواها من النواتج الايضية الثانوية [8]. ونجح التحول الوراثي للسمسم بوساطة *A. rhizogenes* لإنتاج خطوط خلوية من السمسم مقاومة للأمراض نقلت إليها جينات من الأنواع البرية للسمسم [9] كما امكن انتاج مركبات صناعية من جذوره المحولة وراثيا[10]. واستحثاث الجذور الشعرية من سيقان بادراته دون الحصول على التمايز[11].

وأفضت مراجعة المصادر عن قلة البحوث التي تناولت فعالية انزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين وكمية الاحماض النووية في انسجة النباتات المحولة وراثيا وعليه فقد انجز هذا البحث لمعرفة التأثيرات الكيموحيوية في الجذور الشعرية المحولة وراثيا بسلالتين من بكتريا الاكروبكتيريوم لنباتات المحصول الزيتي السمسم.

المواد وطرائق العمل

(1) المادة النباتية

عُقمت مجموعة من بذور الصنف المحلي (رقم 8) للسمسم 300 بذرة بغمرها في 50 ملليتر من الكحول الأثيلي 96% مع التحريك لمدة دقيقتين ثم نقلت إلى100مليتر من محلول القاصر التجاري NaOCl (فاس, شركة بابل للمنظفات, بغداد) المخفف بنسبة 2:1 (قاصر: ماء معقم) لمدة 4-5 دقائق. بعدئذ غسلت بالماء المعقم أربع مرات متتالية 3 دقيقة/ مرة لإزالة آثار محلول التعقيم [8]. وخلصت البذور المعقمة من الماء العالق بها بوضعها على أوراق ترشيح معقمة. وزرعت هذه البذور سطحيا على سطح وسط(موراشيك وسكوك) MS [12] ووسط (ارنون وهوكلاند) AH [13] في قنان زجاجية حجم 100 ملليتر وبمعدل خمسة بذور/ قنينة. حُضنت العينات في غرفة الزرع في ظروف الظلام التام/23±2 درجة سيليزية لمدة ثلاثة أيام لحين إنباتها ثم نقلت إلى ظروف إضاءة 16 ساعة وظلام 8 ساعات وشدة إضاءة 2000 لوكس لمواصلة نموها وإنتاج البادرات المعقمة.

(2) مصادر السلالات البكتيرية المستخدمة:

أستعملت سلالتين من بكتريا *Agrobacterium* في الدراسة الحالية وشملت:

- **السلالة R 1601 من بكتريا *A. rhizogenes*** جهزت من مختبر التطبيقات الوراثية قسم علوم الحياة /كلية التربية/جامعة الموصل والمجهزة أساسا من جامعة واشنطن (Prof E. W. Nester, Washington, Univ USA) الحاملة لعلائمها الوراثية Kana.$^{Res+}$ و Carb.$^{Res+}$ الخاصة بمقاومتها للمضادين الحيويين الكانامايسين والكاربنسلين.
- **السلالة R15834 من بكتريا *A. rhizogenes*** الحاملة لعليمتها الوراثية Rifa.$^{Res+}$ الخاصة بمقاومتها للمضاد الحيوي الريفامبسين. جهزت من مؤسسة U. Gent-VIB Research Belgium في جامعة جينت البلجيكية.

(3) تحضير اللقاحات البكتيرية وتقدير كثافاتها طيفيا:

- **اللقاح البكتيري للسلالة R1601 *A. rhizogenes*** حُضر اللقاح بنقل حملة لوب واحدة من هذه البكتريا النامية على وسط APM الصلب إلى دورق زجاجي سعة 125 ملليتر يحتوي 25 ملليتر من وسط APM السائل مضافاً اليه 100 ملغم لتر $^{-1}$ لكل من الكانامايسين والكاربنسلين حضنت العينات في الحاضنة الهزازة في ظروف الظلام وحرارة 28 درجة سيليزية لمدة 72 ساعة وبسرعة 150 دورة/ دقيقة. حصدت البكتريا بوساطة الطرد المركزي المبرد لمدة 15 دقيقة وبسرعة 1500 دورة/ دقيقة. استبعد الراشح وأضيف ملليتر واحد من وسط APM السائل إلى البكتريا المترسبة متكوناً اللقاح البكتيري. أخذ حجم 1.5 ملليتر منه في أنبوبة ابندروف والأخرى تحتوي 1.5 ملليتر من الوسط APM السائل، قيست كثافتها الضوئية Optical Density بوساطة المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600 نانوميتر [12].
- **اللقاح البكتيري للسلالة R15834 *A. rhizogenes*** نقلت حملة لوب واحدة من البكتريا النامية على وسط YEB الصلب إلى دورق زجاجي سعة 125 ملليتر يحتوي 25 ملليتر من وسط YEB السائل بوجود 100 ملغم لتر $^{-1}$ من الريفامبسين Refambicin. حضنت العينات في الحاضنة الهزازة المشار إليها أعلاه وفي نفس ظروف التحضين المذكورة سابقا. حصدت البكتريا بنفس الطريقة مع إهمال الراشح وأضافة ملليتر واحد من وسط YEB السائل إلى الراسب البكتري منتجا اللقاح البكتيري. وقيست كثافته الضوئية باعتماد الطريقة ذاتها أعلاه[14].

(4) تلقيح البادرات والاوراق بالحقن المباشر بالسلالتين R1601 وR15834 من بكتريا *A. rhizogenes* :

استخدمت البادرات المعقمة النامية في وسط أرنون وهوكلاند الصلب بعمر 14-16 يوم الفاقدة لمجاميعها الجذرية, واستبعدت البادرات النامية في وسط MS لاتصافها ببطء نموها وطول الفترة الزمنية لتكوينها حيث استغرقت 25 يوماً, بينما البادرات النامية في وسط ارنون وهوكلاند تكونت خلال 12-14 يوماً وأمتازت بنموها الطبيعي . كما استعملت عشرات من الأوراق الفلقية بنفس الأعمار اعلاه. لقحت هذهِ العينات بوخزها في 3-4 مواقع مختلفة بوساطة سرنجة طبية مغمورة نهايتها الدقيقة في ملليتر واحد من اللقاح البكتيري [15]، غرست البادرات والأوراق الفلقية الملقحة بغمر جزء من قواعدها السفلية بصورة قائمة في قنان زجاجية حجم 100 مل تحوي 25 مل من الأوساط المعتمدة في دراسات سابقة [16]، , واختبرت الأوساط الآتية:

- **MSO**
- **MS + 50 ملغم لتر$^{-1}$ سيفوتاكسيم**
- **MS 1/2 + 50 ملغم لتر$^{-1}$ سيفوتاكسيم واستبدال الاكار بإضافة 3 ملغم لتر$^{-1}$ اكاروز**. [16]

كما اختبرت الأوساط التي انتخبت في هذه الدراسة وشملت:

- **AH بوجود 50 ملغم لتر$^{-1}$ سيفوتاكسيم**
- **AH +0.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بوجود 50 ملغم لتر$^{-1}$ سيفوتاكسيم**
- **AH +1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA بوجود50 ملغم لتر$^{-1}$ سيفوتاكسيم**

حضنت الزروعات في ظروف إضاءة خفيفة (100 لوكس في 23±2 درجة سيليزية) بفترة اضاءة 16 ساعة وظلام 8 ساعات في غرفة النمو.

(5) الترحيل الكهربائي الورقي للكشف عن الاكروبين في الجذور الشعرية المحولة وراثيا:

كشف عن الحامض الاميني غير الحقيقي، الاكروبين، في عينات الجذور الشعرية وفق الطريقة القياسية [17]. اخذت عينة بوزن 100 ملغم من الجذور الشعرية وعينة أخرى من الجذور الاعتيادية (المقارنة) في أنابيب ابندروف وسحقت جيداً باضافة 100 مايكروليتر من 0.1 عياري حامض الهيدروكلوريك بوساطة قضيب زجاجي ذو نهاية خشنة وأجريت عملية الطرد المركزي لمهروس العينات بسرعة 12000 G ولمدة 15 دقيقة, أخذ 30 مايكروليتر من الرائق المتكون بوساطة أنابيب شعرية وخُمل في مكانهِ المحدد على ورق الكروماتوغرافيا (Whatman No.3) بابعاد 30×15 سم. كما خُمّلت عينة مماثلة في حجمها من مهروس الجذور الاعتيادية لنبات السمسم وأيضاً عينات من الاكروبين القياسي للمقارنة. وبعد الانتهاء من تحميل كافة العينات وجفافها جيداً، ثبتت ورقة الكروماتوكرام في حوض جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis بوجود 500 مل من محلول الفصل [حامض الفورميك: حامض الخليك: ماء مقطر بنسبة 25: 75: 400,حجم:جحم:حجم] وربط الجهاز إلى مصدر الطاقة الكهربائية والسماح بمرور فولتية مقدارها 300-400 فولت لمدة ساعة واحدة. عندها رفعت ورقة الكروماتوكرام لتجفف في الهواء متبوعاً بصبغها بمحلول نترات الفضة $AgNo_3$ وتركها 15-30 دقيقة لتجف ومن ثم غمرها في محلول 2%هيدروكسيد الصوديوم المثيلي Methanolic NaOH لإظهار البقع ومن ثم السماح ثانية لجفافها خلال 30 دقيقة وأخيراً غمرها في محلول 5% ثايوسلفات الصوديوم $Na_2S_2O_3$ لتثبيت الصبغة يعقب ذلك غسلها بماء الحنفية 30 دقيقة والسماح بجفافها في الهواء.

(6) محاولات انشاء مزارع الجذور الشعرية المستحثة بسلالتي *A. rhizogenes*

قطعت الجذور الشعرية المتكونة في مواقع التلقيح المباشر على قطع السيقان بنقل جذور مفردة بطول 2-3 سم او خصل كاملة الى دوارق تحوي 30 ملليتر لكل من الوسط MSO و AH الصلب والسائل.

(7) تقدير الفعالية النوعية للإنزيمات المشاركة في بناء dTMP في مستخلصات الجذور الشعرية المحولة وراثيا:

تضمن تقدير الفعالية النوعية الإنزيمات الآتية:

- **إنزيم الثايميدليت سنثيز Thymidylate synthase (EC 2.1.1.45)**

تقاس فعالية هذا الإنزيم من الزيادة في قيم الامتصاص الضوئي للمحلول عند الطول الموجي340 نانوميتر بوجود الديوكسي يوريدين أحادي الفوسفيت(dUMP) كمادة أساس والتتراهيدروفوليتTHF كعامل مساعد بوساطة المطياف الضوئي عند 30 درجة سيليزية / 10 دقائق[18]. ويتكون محلول التفاعل وبحجم نهائي3 ملليترمن 50 ملي مولار من المحلول المنظم بوتاسيوم فوسفيت عند(7) pH , 1.5 ملي مولارTHF (مذابة في واحد مولار من ميركابتوايثانول7pH), 40 ملي مولار فورمالديهايد50ملي مولار كلوريد المغنيسيوم واحد ملي مولارdUMP وكمية محددة من مستخلص الانزيم وحددت وحدة فعاليته على أنها كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول واحد من مادةDHF خلال دقيقة واحدة من التفاعل باستخدام معامل الامتصاص الضوئي لـDHF والمساوي إلى5.8×10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ [19].

- **إنزيم الداي هيدروفوليت ريدكتيز Dihydrofolate reductase (EC 1.5.1.3)**

قيست فعالية هذا الإنزيم من معرفة الانخفاض الحاصل في قيم الامتصاص الضوئي لمحلول التفاعل عند الطول الموجي 340 نانوميتر بوجود مركبDHF كمادة أساس ومركب NADPH كمانح للهيدروجين [20] ويتكون محلول التفاعل وبحجم نهائي 3 ملليترمن 50 ملي مولار من المحلول المنظم بوتاسيوم فوسفيت عند (6.8) pH , 10ملي مولار كبريتات المغنيسيوم , 10ملي مولار من ميركابتوايثانول, 0.1 ملي مولار EDTA,0.1 ملي مولار DHF , 0.4 ملي مولار NADPH وكمية محددة من مستخلص الانزيم ثم حددت الفعالية بالمطياف الضوئي عند 30 درجة سيليزية / 10 دقائق. وتمثل وحدة الفعالية النوعية للإنزيم كميته اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل باستخدام معامل الامتصاص الضوئي للمركب NADPH الذي يعادل $6.2\times10^3 M^{-1}cm^{-1}$.

- **إنزيم السيرين هيدروكسي ميثايل ترانسفريز Serinehydroxymethyl transfrase (EC 2.1.2.1)**

تحدد فعالية هذا الإنزيم من معرفة الانخفاض في قيم الامتصاص الضوئي للمحلول عند الطول الموجي 298 نانوميتر بوجود السيرين مادة أساس ومادة THF عاملاً مساعداً [21]. ويتكون محلول التفاعل وبحجم نهائي 3 مليلتر من 50 ملي مولار من المحلول المنظم بوتاسيوم فوسفيت عند pH(7) , 5.7 ملي مولار سيرين ,48 ملي مولار من ميركابتوايثانول, 0.04 ملي مولار من THF وكمية محددة من مستخلص الانزيم وقيست فعاليته بالمطياف الضوئي عند30 درجة سيليزية / 10دقائق باعتبار إن الفعالية النوعية للإنزيم تمثل كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من THF إلى 5, 10- methylene THF خلال دقيقة واحدة من التفاعل باستخدام معامل الامتصاص الضوئي لمادة THF الذي يعادل $28 \times 10^{3}M^{-1}cm^{-1}$[22].

(8) تقدير المحتوى البروتيني في الانسجة المحولة وراثيا:

يقدر البروتين الكلي بطريقة فولن [23] المحورة عن الطريقة الاساسية باعتماد الكثافة الضوئية عند الطول الموجي 650 نانوميتر طيفياً. يؤخذ غرام واحد من الجذور الشعرية ويسحق في هاون خزفي يحتوي خمسة ملليلتر من محلول ثالث كلوريد حامض الخليك Trichloroaceticacid(TCA) , وتوضع العينات في قنان زجاجية حجم 100 مل في حمام ثلجي، ثم توضع في الحاضنة الهزازة بسرعة 100دورة / دقيقة / ساعة واحدة. بعدئذ تحصد بوساطة طردها مركزيا بسرعة 5000 دورة/ دقيقة/ 5 دقائق. ويهمل الراشح ويغسل الراسب المتبقي خمسة مرات باستعمال محلول 5% من TCA مع إعادة الترسيب في كل مرة بالظروف السابقة نفسها، ويضاف إلى الراسب 10 ملليلتر من محلول واحد عياري هيدروكسيد الصوديوم ويمزج جيداً ووضعه في الحاضنة الهزازة لمدة 24 ساعة ثم ينبذ بجهاز النبذ المركزي بسرعة 3000دورة/دقيقة. يؤخذ الراشح ويكمل حجمه إلى 10 ملليتر بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم. تحدد كمية البروتين الكلي في المستخلص بأخذ عينة 0.1 ملليتر من الراشح ويضاف إليه 0.9 ملليتر ماء مقطر مع إضافة ملليتر واحد من كاشف كبريتات النحاس المائية القاعدية ويمزج المحلول جيداً ويترك لمدة 10 دقائق بدرجة 25 سيليزية. يضاف إليه 4 ملليتر من كاشف فولن ويمزج المحلول جيداً ويوضع في حمام مائي درجة حرارته 55 درجة سيليزية مدة خمسة دقائق. قيست الامتصاصية الضوئية عند الطول الموجي 650 نانوميتر بالمطياف الضوئي وتحدد الكمية الكلية للبروتين بالمنحني القياسي الناتج من استعمال تراكيز متدرجة بين 50-450 مايكروغرام/مل من مصل البروتين البقري BSA.

(9) تقدير الأحماض النووية الكلية:

أ- استخلاص الحوامض النووية الكلية

تنفذ تجارب استخلاص الاحماض النووية الكلية بأخذ غرام واحد من الجذور الشعرية المحولة وراثيا وسحقها في هاون خزفي مبرد مسبقا بدرجة صفر سيليزية بوجود 10 ملليتر من محلول 96% من الكحول المثيلي المحفوظ في 4 درجة سيليزية[24]. ينبذ المزيج مركزياً عند 4 درجة سيليزية وبسرعة 1500 دورة/ دقيقة/7 دقائق. يستبعد الرائق وغسل الراسب عدة مرات بالكحول المثيلي 96% المبرد, أعقبه غسل الراسب مرات عدة باضافة حامض البركلوريك Perchloric acid (PCA) بتركيز 0.2 مولار. نبذت العينة بسرعة 2000 دورة/ دقيقة /10 دقائق وأضيف إلى الراسب 10 ملليتر محلول96% من الكحول الأثيلي. ينبذ المحلول مركزياً بسرعة 2000 دورة/ دقيقة /10 دقائق. يضاف إلى الراسب 10 ملليتر من مزيج الكحول الأثيلي: الايثر بنسبة 2:1 (حجم: حجم) ويوضع في فرن حرارته 50 درجة سيليزية مدة 30 دقيقة. ينبذ المزيج مركزياً كما في الخطوة السابقة ويضاف إلى الراسب 10 ملليتر من حامض (PCA) بتركيز 5%، ويترك المحلول مدة 45 دقيقة في فرن حرارته 70 درجة سيليزية. ثم يترك المحلول في درجة 4 درجة سيليزية مدة 24 ساعة, وينبذ الحلول مركزياً بسرعة 2500 دورة/ دقيقة/ 15 دقيقة. يؤخذ الرائق ويكمل حجمه إلى الحجم القياسي10مل بإضافة محلول 5% من حامض (PCA).

ب- تحديد كمية الحامض النووي DNA الكلي

تتبع الطريقة القياسية **[25]** في تحديد كمية DNA المعتمدة في استخدام كاشف الأمين ثنائي الفينول Diphenyl amine reagent الذي يحضر بإذابة غرام واحد منه في 100 ملليتر من حامض الخليك الثلجي glacial acetic acid. يؤخذ ملليتر واحد من الراشح الحاوي على الحوامض النووية ويضاف إليه 2.0 ملليتر من كاشف الأمين ثنائي الفينول ويمزج جيداً في أنبوبة اختبار، ثم يضاف إليه 0.1 ملليتر من المحلول المائي للاستيالديهايد Acetaldyehyde بتركيز 0.6 ملغم/ مل. يترك المحلول مستقراً مدة 24 ساعة في ظروف 25-28 درجة سيليزية. تقدر كمية الحامض النووي DNA من إيجاد الفرق بين شدة الكثافة الضوئية للمحلول عند الطول الموجي 700 نانوميتر والطول الموجي 595 نانوميتر بوساطة المطياف الضوئي ومقارنتها مع منحناه القياسي الناتج من استعمال تراكيز متدرجة تراوحت بين1-10 مايكروغرام/ م من الحامض النووي DNA الغدة الدرقية للعجل DNA Calfthymus.

النتائج

1 - إنتاج البادرات السليمة: أنتجت بادرات السمسم السليمة من بذوره المعقمة سطحياً عند زراعتها على الوسط الصلب أرنون وهوكلاند الذي أظهر افضليته لإنباتها وتكوينه للبادرات من تلك المتكونة على الوسط MSO.

2 - احتفاظ السلالات البكتيرية بعلائمها الوراثية:

أظهرت النتائج احتفاظ السلالتين المستخدمتين بعلائمهم الوراثية المناسبة وعلى النحو الاتي:

- احتفاظ السلالة R 1601 من بكتريا *A. rhizogenes* بعلائمها الوراثية $Carb.^{Res.+}$ و $Kana^{Res.+}$ عند مستوى 100 ملغم لتر$^{-1}$ لكل من المضادين في الوسط APM.
- احتفاظ السلالة R15834 من بكتريا *A.rhizogenes* بعليمتها الوراثية $Refa.^{Res.+}$ عند مستوى100 ملغم لتر$^{-1}$ من الريفامبسين في الوسط YEB.

3 - استحثاث الجذور الشعرية على بادرات السمسم المزالة مجاميعها الجذرية واوراقها المفصولة بتلقيحها ببكتريا *A. rhizogenes* بحقنها المباشر بالسلالة R1610:

أظهرت البيانات ان تلقيح البادرات المعقمة الفاقدة لمجاميعها الجذرية بكل من الكثافات المتباينة 60، 96، 165، 235 × 10^{-8} خلية/ مل من المعلق البكتيري وزراعتها بشكل قائم في وسط ارنون وهوكلاند الصلب تحملها عملية التلقيح وبزوغ الجذور الشعرية من مواقع

التلقيح وفي مواقع اخرى غير ملقحة. وتباينت الجذور الشعرية في استحثاثها والمدة اللازمة لتكونها باختلاف كثافة اللقاح المستخدم جدول (1).

جدول (1): استحثاث الجذور الشعرية على بادرات السمسم *Sesamum indicum* L. المزالة مجاميعها الجذرية واوراقها المفصولة الملقحة بالسلالةR1601 من بكتريا *A. rhizogenes* بطريقة الحقن النامية في وسط AH الصلب

كثافة اللقاح (×10^8 خلية/مل)	البادرات الفاقدة لمجاميعها الجذرية			الأوراق المفصولة			المدة (يوم)
	الاعداد الكلية للبادرات المقلحة/المستجيبة	الجذور الشعرية (%)	معدل عدد الجذور/ بادرة	الاعداد الكلية للأوراق الملقحة/المستجيبة	الجذور الشعرية (%)	معدل عدد الجذور/ورقة	
260	6/30	20.0	3-2	0/20	0	0	25
155	14/50	28.0	4-2	4/30	13.3	2-1	20
80	98/180	54.4	11-8	11/30	36.7	6-2	12
45	4/30	13.3	2	5/20	25	1	27
المقارنة*	0/20	0.0	0	0/20	0	0	-

*** تمثل المقارنة العينات الملقحة بماء مقطر.**

وتعزز بيانات الجدول اعلاه أن البادرات المزالة مجاميعها الجذرية كانت أكثر استجابة من اوراقها المفصولة. وان الكثافة 96×10^{-8} خلية/ مل كانت الأكفأ في استحثاث الجذور مستغرقة 20 يوماً. و يلاحظ تباين الكثافات الأخرى بشكل واضح في تكوينها للجذور وغياب نشؤها في عينات المقارنة. وعموما فان الزيادة في اعداد البادرات الملقحة بهذه الكثافة يهدف لاستحثاث اكبر عدد من الجذور لاستخدامها في تجارب لاحقة.

4 - الحقن المباشر بالسلالة R 15834:

تعبر النتائج في جدول (2) ان بادرات السمسم المعقمة الفاقدة لمجاميعها الجذرية الملقحة واوراقها المنفصلة بكثافات متباينة من اللقاح والنامية في وسط ارنون وهوكلاند الصلب عن احتفاظ العينات الملقحة بحيويتها وايضا بزوغ الجذور الشعرية في المواقع الملقحة وفي مواقع اخرى غير ملقحة جدول (2).

جدول (2): استحثاث الجذور الشعرية على بادرات السمسم *Seamum indicum* L. المزالة مجاميعها الجذرية واوراقها المفصولة الملقحة بالسلالة R15834 من بكتريا *A. rhizogenes* بطريقة الحقن النامية في وسط AH الصلب

كثافة اللقاح (×10^8 خلية/مل)	البادرات الفاقدة لمجاميعها الجذرية			الأوراق المفصولة			المدة (يوم)
	الاعداد الكلية للبادرات المقلحة/المستجيبة	الجذور الشعرية (%)	معدل عدد الجذور/ بادرة	الاعداد الكلية للأوراق الملقحة/المستجيبة	الجذور الشعرية (%)	معدل عدد الجذور/ورقة	
260	6/30	20.0	3-2	0/20	0	0	25
155	14/50	28.0	4-2	4/30	13.3	2-1	20
80	98/180	54.4	11-8	11/30	36.7	6-2	12
45	4/30	13.3	2	5/20	25	1	27
المقارنة*	0/20	0.0	0	0/20	0	0	-

*** تمثل المقارنة العينات الملقحة بماء مقطر.**

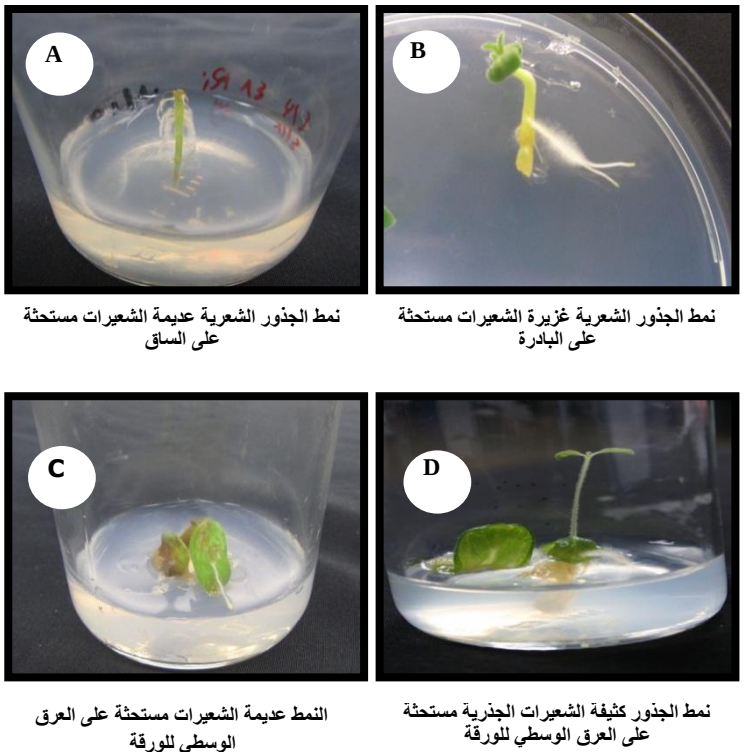
ويعبر الجدول اعلاه عن زيادة اعداد الجذور الشعرية المستحثة على البادرات الفاقدة لمجاميعها الجذرية عن نظيراتها المستحثة على الأوراق المفصولة عند تلقيحها بالكثافة 80×10^{-8} خلية/ مل حقنا مباشرا بالسلالة R15834. وتعكس هذه البيانات الدور المهم للكثافة المستخدمة في عمليات التلقيح .

وعموما أتضح ان السلالة R15834 من بكتريا *A. rhizogenes* كانت الاكفأ في استحثاثها للجذور الشعرية من السلالةR1601 لنفس البكتريا. وهذا يعكس اهمية دور السلالات المختلفة من نفس البكتريا في تحفيز هذه الجذور. و يلاحظ ان البادرات كانت أفضل من الأوراق عند تلقيحها بكل من هاتين السلالتين فضلا عن الزيادة في اعداد الجذور المتكونة بوساطة السلالة R15834 . وأن قسماً من الجذور المتكونة بوساطة السلالة R15834 نشأت بهيئة خصل من الجذور افتقدت اليها السلالةR1601.

واظهرت محاولات تنمية الجذور الشعرية في عدة اوساط فشلها في تكوين مزارعها وعدم نموها وتحول لونها الى البني ومن ثم موتها بعد اسبوع من نقلها الى هذه الاوساط.

5 - توصيف الجذور الشعرية المتكونة:

ظهرت الجذور الشعرية بعد20 يوماً عند استخدام السلالة R1601 و12 يوماً عند استخدام السلالة R15834 في مواقع الحقن المباشر والمواقع الأخرى غير الملقحة على كل من البادرات المزالة مجاميعها الجذرية واوراقها المفصولة والنامية في وسط ارنون وهوكلاند . وأظهرت الجذور الشعرية المستحثة بوساطة السلالةR1601 على البادرات المزالة مجاميعها الجذرية وقطع سيقانها نمطين من تراكيب خيطية رهيفة بيضاء اللون الاولى عديمة الشعيرات الجذرية موجبة للانتحاء الارضي شكل (1A) والثانية غزيرة الشعيرات الجذرية ذات نهاية متفرعة شكل (1B) سالبة للانتحاء الأرضي. وتراوحت اعدادها بين 1-7 جذور لكل موقع تلقيح. وظهورها ايضا على العرق الوسطي للأوراق المفصولة وكانت من النمط عديم الشعيرات الجذرية الشكل(1C) واخرى حاوية شعيرات جذرية شكل (1D) وتراوحت اعدادها المتكونة من1-2 جذر لكل موقع تلقيح.



نمط الجذور الشعرية غزيرة الشعيرات مستحثة على البادرة

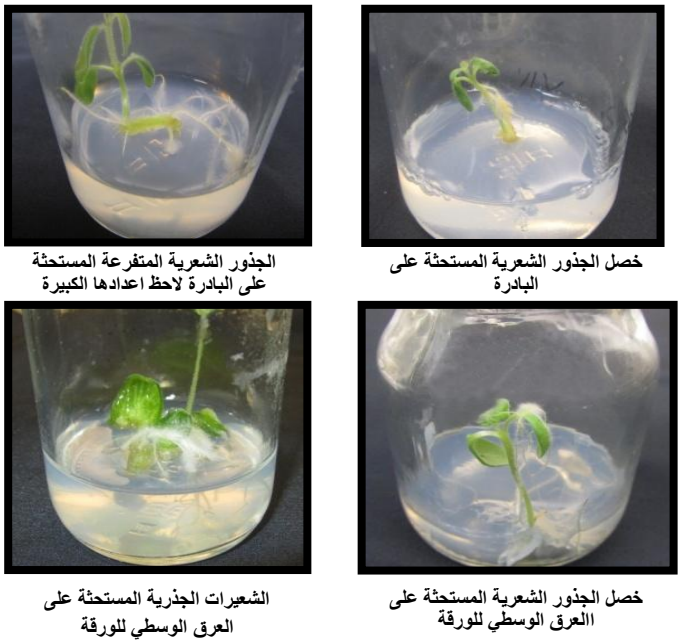
نمط الجذور الشعرية عديمة الشعيرات مستحثة على الساق

نمط الجذور كثيفة الشعيرات الجذرية مستحثة على العرق الوسطي للورقة

النمط عديمة الشعيرات مستحثة على العرق الوسطى للورقة

شكل (1): نمط الجذور الشعرية المستحثة على بادرات السمسم *Sesamum indicum* L. الفاقدة لمجاميعها الجذرية وعلى قطع السيقان والاوراق المفصولة بوساطة السلالة R1601 من بكتريا *A. rhizogenes* والنامية في الوسط AHالصلب بوجود 50 ملغم لتر $^{-1}$ من السيفوتاكسيم .

بينما بثت الجذور الشعرية المستحثة بوساطة السلالة R15834 ايضا بهيأة تراكيب خيطية بيضاء اللون غزيرة الشعيرات الجذرية وبأعداد كبيرة سالبة للانتحاء الارضي واحيانا موجبة شكل(2A) واحيانا ظهورها بشكل خصل في موقع تلقيح البادرات شكل(2B) وكذلك على الورقة ذات شعيرات جذرية شكل (2C) واحيانا ظهورها بشكل خصل على الورقة شكل(2D), ويعد تكوين هذهِ الجذور العرضية بفعل هذه البكتريا أولى العلامات الدالة بان هذه الجذور محولة وراثيا.



خصل الجذور الشعرية المستحثة على البادرة

الجذور الشعرية المتفرعة المستحثة على البادرة لاحظ اعدادها الكبيرة

خصل الجذور الشعرية المستحثة على االعرق الوسطي للورقة

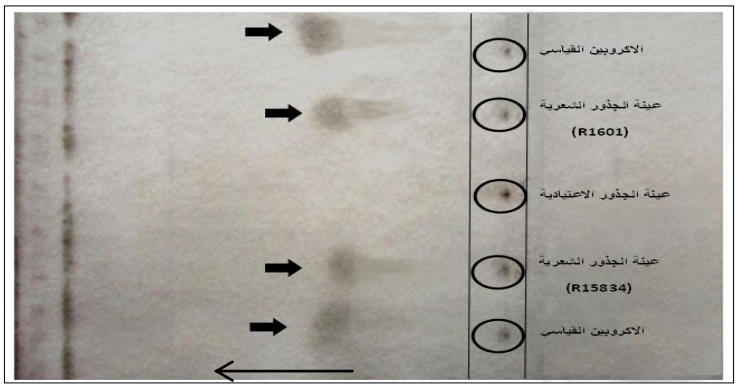
الشعيرات الجذرية المستحثة على العرق الوسطي للورقة

شكل(2): الجذور الشعرية او خصلها المستحثة على بادرات السمسم *Sesamum indicum L.* المزالة مجاميعها الجذرية او اوراقها بوساطة السلالة R15834 من بكتريا *A. rhizogenes* النامية في الوسط AHالصلب بوجود50ملغم لتر$^{-1}$ من السيفوتاكسيم

- الكشف عن الاكروبين في الجذور الشعرية المستحثة بوساطة سلالات بكتريا *A. rhizogenes*

بكتريا *A. rhizogenes* انفصال بقع سوداء اللون مناظرة في موقعها إلى موقع بقعة الأكروبين القياسي وغياب انفصالها من مستخلص عينة الجذور الاعتيادية شكل(3).

تؤكد هذه النتائج ان انسجة الجذور الشعرية المتكونة بفعل السلالتين من هذه البكتريا قد تحولت وراثيا وان بناء هذا الحامض الأميني غير الاعتيادي يعبر عن نجاح التعبير الجيني للجينات المحَمولة في منطقة T-DNA من بلازميدات Ri إلى جينوم الخلية النباتية.



شكل (3): كروماتوفوريتوكرام انفصال الحامض الاميني (الاكروبين) من مستخلصات الجذور الشعرية المستحثة على بادرات السمسم بوساطة كل من السلالتين R1601 و R15834 من بكتريا *A. rhizogenes*.

7- الفعالية النوعية لأنزيمات بناء dTMP وكمية الاحماض DNA و RNA في انسجة السمسم المحولة وراثيا.

تعبو النتائج في جدول (3) عن زيادة واضحة في الفعالية النوعية لكل من الأنزيمات TS وDHFR وSHMT في مستخلصات الجذور الشعرية المحولة وراثيا "المنتجة للاكروبين" بوساطة كل من السلالتين R1601 وR15834 التابعة لبكتريا *A. rhizogenes*. وان الزيادة الحاصلة في فعالية هذه الانزيمات بوساطة السلالة R15834 تقارب ضعف قيمتها المسجلة في الجذور المستحثة بفعل السلالة R1601 من نفس البكتريا. وفي كلتا الحالتين فان هذه الزيادة تجاوزت فعالية الانزيمات في عينات المقارنة من الجذور الاعتيادية.

الجدول (3): الفعالية النوعية لإنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين وكميات الاحماض النووية RNA,DNA في مستخلصات الجذور الشعرية المحولة وراثيا المستحثة بوساطة سلالتين من بكتريا *A. rhizogenes* في نباتات السمسم *Sesamum indicum* L. .

المستخلص	الفعالية النوعية لأنزيمات (مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين) ± الخطأ القياسي						كمية الاحماض النووية (مايكروغرام غم$^{-1}$)	
	TS*		DHFR**		SHMT***		DNA	RNA
الجذور الشعرية المستحثة ببكتريا AR1601	3.860	0.032∓	0.855	0.061∓	0.316	0.021∓	97 b	945 b
الجذور الشعرية المستحثة ببكتريا AR15834	4.610	0.071∓	1.057	0.052∓	0.480	0.025∓	105 a	1020 a
الجذور الاعتيادية (المقارنة)	1.256	0.031∓	0.097	0.042∓	0.125	0.003∓	44c	462 c

*** TS: كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول منDHF \ دقيقة \ ملغم بروتين.**

**** DHFR: كمية الإنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول من NADPH \ دقيقة \ ملغم بروتين.**

***** SHMT: كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول من THFإلى Methylene THF \دقيقة \ملغم بروتين.**

تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية اكبر من 0.0001 بين المتوسطات باختبار DMRT, كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.

المناقشة

ان صعوبة انبات بذور السمسم على الوسط MSO وطول الفترة الزمنية للحصول على البادرات بالرغم من ان معظم المصادر تشير إلى تنمية بذوره في وسط MSO [26], الا أن بذور الصنف المعتمد في هذه الدراسة فشلت في انباتها في الوسط MSO وفي حال تكونها كانت بادرات ضعيفة في نموها بينما امتازت تلك الناتجة من زراعة بذوره على وسط ارنون وهوكلاند الصلب بسلامة نموها. وهذا قد يفسر دور التركيب الوراثي للصنف المستخدم وتداخلاته مع مكونات وسط الزراعة حيث وجدت الدراسات ان تعدد اصنافه له تأثير كبير في زراعة الانسجة [27].

ذكرت العديد من المصادر ان نبات السمسم من النباتات التي تبدي صعوبة واضحة في استجابتها لتقانات التحول الوراثي[28]. إن النجاح الذي حققتهُ الدراسة الحالية متمثلا في الحصول على أنسجة سمسم محولة وراثياً باعتماد السلالتين من البكتريا التابعة لجنس الاكروبكتيريوم يعد مهما جدا ويشير الى التوافق الحاصل بين نوع الانسجة المختبرة مع السلالة البكتيرية المستخدمة والتقانة المعتمدة. وان استجابة بادرات السمسم بالتلقيح بالحقن المباشر وبزوغ هذه الجذور الشعرية مع تباين نسبة استحثاثها متأثرة بنوع السلالة كان يهدف للحصول على الأنسجة المحولة وراثياً لهذا المحصول الزيتي المهم لمتابعة انعكاسات حالة التحول في فعالية انزيمات بناء

dTMP من معرفة فعالية انزيمات TS وDHFR وSHMT ومعرفة كميات الأحماض DNA وRNA فيها. ويفسر ظهور الجذور الشعرية العلامات الاولية لحدوث التحول الوراثي وهذا يعزى إلى انتقال الجينات المستقرة على قطعة T-DNA من بلازميد Ri إلى المادة الوراثية للخلية النباتية مترتبا عنه حصول خلل هرموني في الأوكسينات والسايتوكاينينات بسبب مجموعة *Onco-genes* الواقعة على T-DNA التي تشفر انزيمات تصنيع الأوكسينات [29] وتعتمد مدة ظهورها على نوع الجزء النباتي والسلالة من *A.rhizogenes* حيث تظهر خلال أيام أو عدة أسابيع وهذا يفسر تكون الجذور الشعرية المحولة وراثياً وظهورها في مواقع حقن البادرات والأوراق لنبات السمسم بعد مدة قصيرة من تلقيحها بالسلالة R15834 وطول هذه المدة عند تلقيحها بالسلالة R1601. فقد ذكرت احدى الدراسات استجابة بادرات السمسم للتلقيح بالحقن المباشر بالسلالة ATCC15834 وتكوينها للجذور الشعرية بعد 25 يوما من تلقيحها[30] وذكرت أخرى تكونها باستخدام السلالة نفسها بعد 14 يوماً من التلقيح وتكوين مزارع منها في الوسط الغذائي السائل لاستخلاص 2-geranyl-1,4-naphthoquinone[16] إلا أن هذه الدراسات فشلت في الحصول على نباتات محولة وراثياً.

إن الاستجابة العالية للبادرات الفاقدة لمجاميعها الجذرية بالحقن المباشر ببكتريا *A. rhizogenes* وتكوين الجذور الشعرية باستخدام السلالتين R1601 وR15834 مقارنة باستجابة الأوراق الفلقية قد يعزى إلى تباين اعداد الخلايا التي تستجيب للتلقيح بالحقن المباشر بالبكتريا [31] فضلاً إلى امتلاكها محتوى مناسب من منظمات النمو كافٍ لإظهار الاستجابة. كما ان نجاح التوافق بين هذه البكتريا وانسجة السمسم يعبر عن توفر متطلبات حدوث هذه العملية متضمنة احداث الجروح وافراز المواد الجاذبة للبكتريا وتحمل مجموعة جينات ويعزز هذا التفسير بزوغ الجذور الشعرية من مواقع تلقيح بادرات وأوراق السمسم ببكتريا الاكروبكتريوم في هذه الدراسة وإن هذه العينات من الجذور محولة وراثياً بدليل ايجابية اختبار الاكروبين والذي يتكون بفعل جينات تصنيع الاوبينات المنقولة على قطعة T-DNA إلى نواة الخلايا المحولة والتعبير عنها بتكوين هذه الأحماض الأمينية غير الاعتيادية التي تستغلها البكتريا كمصادر للنتروجين والكربون والطاقة اللازمة لها في عملية تداخلها مع النبات. وإن قابلية البكتريا للاستفادة من هذه الأحماض يعود إلى امتلاكها لعدد من الجينات المسؤولة عن بناء انزيمات تدعى Opine oxidase[32]. كما ان إزالة بكتريا الأكروبكتيريوم من مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً يجنب التداخل بين الخلايا المحولة وراثياً والبكتريا والذي قد ينعكس سلباً في نموها وان نجاح السيفوتاكسيم في هذه المهمة يفسر دوره هذا بتغيره أزموزية الأغشية الخلوية للبكتريا فضلاً عن تأثيره في مسارات تخليق البروتينات والانزيمات وتضاعف الأحماض النووية وعمليات انقسام الخلايا البكتيرية والتي قد تؤدي إلى موتها أحياناً.

ان زيادة الفعالية النوعية للإنزيمات المدروسة في الانسجة المحولة وراثيا يعزى الى أن تعبير جينات انزيمي DHFR وTS ذات الوظيفة الثنائية وجدت بصورة رئيسية وبمستوى عالي في الأنسجة المرستيمية في الخلايا وهذه الانزيمات لها علاقة مباشرة ببناء الثايميدليت أثناء دورة الخلية. اذ وجد أن التعبير الجيني لهذه الانزيمات يكون بمستوى عالي في المعلقات الخلوية لنبات الجزر في الطور اللوغاريتمي اكثر مما هي في الطور الثابت وأن تعبير الجينات لإنزيمي DHFR وTS تختلف باختلاف النبات والجزء النباتي حيث وجد أن تعبير جينات هذين الانزيمين ذات مستوى قليل في أوراق الجزر على عكس ما وجده [33] في مايتوكوندريا أوراق البزاليا وجود تجمعات كبيرة لهذين الانزيمين. وهذا الاختلاف يعود إلى جينات Paraloggen والتي تعبر بصورة مختلفة أثناء تطور الخلايا كما أن التضاعف الجيني أو التحوير الجيني له القابلية في زيادة انتاج انزيمي TS وDHFR اذ لوحظت زيادة مستوى الانزيمين عشرة مرات في خلايا الجزر[34].

المصادر

1. Donald, D., Cynthia, M. and Patrick, J. (2011). Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria. Graduate Field of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, Cornell University, Ithaca, NY, USA.
2. Ahmad, G., Abbas, N. and Sam, S. (2011). Inhibitory effect of some methanol plant extracts on dihydrofolate reductase. Toxicol. and Environm. Chem. 93: 261-269.
3. Donald, D., Collynn, F., Chiang, E., Barry, S. and Patrick, S. (2012). Serine Hydroxymethyl transferase Anchors de novo thymidylate synthesis pathway to nuclear lamina for DNA synthesis. J. Biol. Chem. 287: 7051-7062.
4. Chabaud, M., Boisson-pernier, A., Zhang, J., Taylor, C.G., Yu, O. and Barker, D.G. (2006). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. Mol. Plant-Microbe Interact. 18: 1269-76.
5. Pulawska, J. (2010). Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp. J. Plant Path. 92: 187-198.
6. Babaoglu, M., Davey, M. R., Power, J. B. ; Sporer, F. and Wink, M. (2003). Transformed roots of *lupines mutabilis*: induction, culture and isoflavone biosynthesis. Plant, Cell Tiss. and Org. Cult. 78: 29-36.
7. الملاح, مزاحم قاسم ومحمد, امجد عبدالهادي . (2012). انتقال جينات المحمولة على بلازميدات من بكتريا بوساطة الحقن المباشر والزراعة المرافقة الى انسجة الجزر وتكوين مزارع الجذور الشعرية المحورة وراثيا. المجلة العراقية للتقانات الحياتية. 11: 227-239 .
8. Baskaran, P. and Jayabalan, N. (2006). *In vitro* mass propagation and diverse callus orientation on *Sesamum indicum* L. an important oil plant. J. Agric. Technol. 2: 259-269.
9. Gao, Z. Z., Ying, D., Lin, W. X., Hua, C.X. and Ying, S.M. (2004). Breeding sesame lines with high resistance introduced with foreign DNA by the pollen tubepath. Chin. J. Oil Crops Sci. 26-31.
10. Jin, U. H., Chun, J. A., Han, M. O., Lee, J. W., Yi, Y. B., Lee, S.W. and Chung, C.H. (2005). Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase. Process Biochem. 40: 3754-3762.

11. Chun , S. A, Lee, J.Y., Yi, Y. B., Park, G.Y., Chung, C.H. (2009). Induction of hairy roots and characterization of Peroxidase expression as a potential root growth marker in sesame. Biochem. and Biotechnol. 39: 345-359.

12. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473- 497.

13. Arnon, D. I. and Hoagland, D.R. (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture methods, Biol. Rev. 19: 55- 67.

14. Al-Mallah, M. K., Davey, M. R. and Cocking, E. C. (1987). Enzymatic treatment of clover root hairs removes a barrier to Rhizobium host specificity. Bio. Technology. 5: 1319- 1322.

15. Al- Mallah, M.K. and Cocking, E. C. (1997). Protoplasts isolation from transformed hairy roots of *Solanum dulcamara* L. Dirasat, Nat. and Eng. Sci. 24: 521-527.

16. Furumoto, T., Ohara, T., Kuba, T., Kawanami, Y. and Fukui, H. (2007). 2- Geranyl- 1, 4-naphthoquinone, apossible intermediate of Anthrquinones in a *Sesamum indicum* L. hairy root culture. Biosci. Biotechol, Biochem. 71: 2600-2602.

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

18. Friedkin, M. (1963). Thymidylate Synthetase Ed.; Mesister, Adv. In Enzym. 38: 235- 292.

19. Mathews, C. K., Scrimgeour, K. G. and Huennekens, F. M. (1963). Dihydrofolic acid reductase. (Eds.: Colowick, S. P. and Kaplau, N.O. Meth. in Enzymol. 6: 364- 368.

20. Osborne, M. J. and Huennekens, F. M. (1958). Enzymatic reduction of dihydrofolic acid. J. Biol. Chem. 233: 969- 974.

21. Uyeda, K. and Rabinowitz, J.C. (1968). Enzymes of the clostridial purine fermentation serine hydroxymethyl transferase. Archs. Biochem. Biophys. 123: 271- 278.

22. Huennekens, F. M., Ho, P. P. and Scrimegour, K. G. (1963). Preparation and Properties of Active Form aldehyde and Active formate. Eds. ; Colowick, S.P. and Kaplau, N.O.) Meth. in Enzymol. 6: 806- 811.

23. Schacterle, G. R. and Pollack. R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials. Ann. Biochem. 51: 654- 655.

24. Cherry, J. H. (1962). Nucleic acid determination in storage tissue of higher plants. Plant Physiol. 37: 670- 678.

25. Giles, K.W. and Mayer, A. (1967). Determination of DNA concentration with diphenylamine reagent. Meth. in Enzymol. 12: 163.

26. Raja, A. and Jayabalan , N. (2011). *In vitro* shoot regeneration and flowering of sesame (*Sesamum indicum* L.) C.V. SVPR-1. J. Agricultural. Tecnol. 7: 1089- 1096.

27. Pham, T.D. (2011). Analysis of Genetic Diversity and Desirable Traits in sesame (*Sesamum indicum* L. pedaliaceae). Implications for breeding and conservation. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.

28. Yadav, M., Chaudhary, D., Sainger, M. and Jaiwal, P. K. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of sesame (*Sesamum indicum* L.). Plant Cell, Tissu. and Org. Cult. 103: 371-386.

29. Chattopadhyay, T., Roy, S., Mitra, A. and Maiti, M. K. (2011). Development of a transgenic hairy root system in jute (*Corchorus capsularis* L.) with *gus* A reporter gene through *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation plant cell Repts. 30: 485-493.

30. Ogasawara, T., Chiba, T., Tada, K. (1993). Production of high yield of a naphtha Quinone by a hairy root culture of *S. indicum*. phytochem. 33: 1095-1098.

31. Schmidt, J. F., Moore, M. D., Pelcher, F. and Covello, P. S. (2007). High efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Saponaria vaccaria* L. (caryphyllaceae) using fluorescence selection. Plant cell. Repts. 26: 1547-1554.

32. Dessaux, Y., Peti, A. and Tempe, J. (1993). Chemistry and biochemistry of opins. Chemical mediatiors of parasitism. Phytochem. 34: 129-132.

33. Neuburger, M., Rebeille, F., Jourdain, A., Nakamura, S. and Douce, R. (1996). Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. J.Biol. Chem. 16: 66-72.

34. Balestrazzi, A., Luok, M, Cella, R. (1997). Gene amplification and enzyme modification one responsible for the methotrexate- resistance of two carrot cell lines that overproduce bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. J. of Experi. Bot. 48: 1393-1400.