

CHAPTER 7

ARABIC SUMMARY

الملخص العربي

أكتشاف الأشكال المظهرية المتعددة للنيكلوتيدات الفردية الخاصة ببعض جينات تحمل الضغوط اللاحوية لبعض أصناف القمح المصرية

يحتل قمح (*Triticum.aesivum* L) المرتبة الأولى بين محاصيل الحبوب على مستوى العالم من حيث المساحة و الإنتاج. وهو يتميز بحساسيته لدرجة الحرارة، فدرجة الحرارة المثلى لنباتات القمح تقع ما بين ١٥- ١٨ °م والقمح من المحاصيل التي تتعرض للإجهاد الحرارى المزمن خلال المراحل الفسيولوجية المختلفة للنمو مما يؤثر على جودة وكمية الانتاج . ولقد قدرت نماذج المناخ العالمية زيادة متوسط درجة الحرارة ما بين ١,٨ و ٥,٨ °م. على الصعيد العالمي خلال القرن الحالى كنتيجة للتغيرات المناخية مما سوف يؤثر على حوالي سبعة ملايين هكتار من القمح خلال دورة حياته وعلى ٤٠٪ من باقى المحاصيل، كما وتنبأ الدراسات المناخية بزيادة متوسط درجة الحرارة ١,٤ درجة مئوية و ٢,٥ درجة مئوية بحلول عام ٢٠٥٠ و ٢١٠٠ مما قد يتسبب فى انخفاض إنتاجية أهم محاصيل فى مصر: القمح و الذرة بنسبة ١٥٪ و ١٩٪ على التوالي بحلول عام ٢٠٥٠ مع يودى الى زيادة انخفاض الأمن الغذائى وانتشار الفقر. يستهلك القمح فى الغالب بالدول النامية بالمنطقة الاستوائية وشبه الاستوائية المكتظة بالسكان ويصل الإنتاج المحلى من القمح فى مصر حوالى ٨ مليون طن وهو يغطى أقل من ٦٠٪ من الاستهلاك المحلى و لذلك لا تزال مصر أكبر مستورد للقمح فى العالم وفقا لتقارير منظمة الفاو ٢٠١٣ و يقدر متطلبات الحبوب فى السنة الحالية ١٤/٢٠١٣ (يوليو / يونيو) بنحو ١٥,٤ مليون طن.

وفقا لمركز تحسين الذرة والقمح الدولية، قد يؤثر تغير المناخ على إنتاج محصول القمح بصورة مباشرة يظهر فى العمليات الفسيولوجية متمثلا فى التمثيل الغذائى، وسيولة الأغشية الخلوية ودرجة تجمع البروتين و شكل الهيكل الخلوي. وتقوم الخلية بانتاج بروتينات الصدمة الحرارية حتى تتواءم وتتكيف مع التأثير الضار للصدمة الحرارية كنوع من التعبير الجينى استجابة للتغيرات الحرارية. ومع ذلك، فإن درجات الحرارة الأعلى من درجات الحرارة المثلى للنمو قد تتسبب فى احداث إصابة أو أضرار لا رجعة فيها، وهو ما يسمى عموما "الإجهاد الحرارى"، ولذلك نحن بحاجة إلى فهم كيفية استجابة المحاصيل للتغيرات فى درجات الحرارة المرتفعة وكيف يمكن تحسينها وإنتاج أصناف جديدة من القمح تتحمل التغيرات المناخية فى المستقبل. وتلعب بروتينات الصدمة الحرارية (HSPs) دورا أساسيا فى منع أو تقليل الآثار الضارة لارتفاع درجة الحرارة على المستويات الخلوية والجزيئية. وعلاوة على ذلك، فهي تساعد الخلايا على استعادة نشاطها وحيويتها خلال فترة ما بعد التعرض للإجهاد الحرارى، وقد تأكد هذا الدور من خلال دراسة بروتين HSP101 وهو أحد بروتينات الصدمة الحرارية و التى تعمل معا بشكل تعاونى فى أذابة التجمعات البروتينية و التى تشكل استجابة للإجهاد الحرارى.

والهدف من هذه الدراسة هو تقييم درجة تحمل ستة أصناف مصرية من قمح الخبز (مصر ١، سدس ١٢، مصر ٢، جيزة ١٦٨، سخا ٩٣ و جميزة ٩) لإرتفاع درجة الحرارة. يتم التقييم من خلال القياسات الفسيولوجية والبيوكيميائية بما فى ذلك درجة صمود الغشاء الخلوى، محتوى الكلوروفيل ومحتوى البرولين لأوراق البادرات، أما على المستوى الجزيئى فسوف يتم استخدام تكتيك التحديد الكمى و الوقت الحقيقى لتفاعل النسخ العكسى البلمرة المتسلسل (Quantitative Real-time PCR) لقياس كمية التعبير الجينى HSP101 تحت ظروف الإجهاد الحرارى المختلفة ثم تحديد النيكلوتيدات الفردية المتباينة (SNPs) فى جين HSP101c الخاص بقمح الخبز المصرى.

١ - الدراسات الفسيولوجية والبيوكيميائية

تم اختيار ستة من أصناف القمح المصرية الأكثر شيوعا لتقييم تحملها لإرتفاع درجة الحرارة. حيث تم تنمية بادرات القمح لمدة ٨ أيام على درجة حرارة ٢٥ °م و ثم تركها كمجموعة ضابطة (كنترول). تم تعريض مجموعة أخرى من البادرات لدرجة حرارة ٣٥ °م لمدة ٤٨ ساعة وذلك لدراسة تأثير الإجهاد الحرارى.

١. أظهرت نتائج دراسة اختبار درجة تحمل الغشاء الخلوى للحرارة (cell membrane thermostability) أن أصناف مصر ١، سدس ١٢، مصر ٢ كانت الأصناف الأكثر حساسية حيث سجلت نسبة إصابة حوالى (٨٣، ٧٨، ٧٥) % على التوالي بينما أظهرت أصناف جميزة ٩ وسخا ٩٣ نسبة إصابة (٤٩، ٤٦) % على التوالي (نسبة الإصابة Relative injury أكثر من ٥٠% تعتبر حساسة واقل من ٥٠% تعتبر متحملة).

٢. صنف مصر (٢) كان الأكثر إنخفاضاً فى إجمالي محتوى الكلوروفيل نتيجة للإجهاد الحراري (٨٧، ٦) %، يليه صنف مصر ١، الجميزة ١٦٨، سدس ١٢ بنسبة (٧٦، ٨) %، (٧٥، ٩) % و (٦١، ٦) % على التوالي. ومن ناحية أخرى فقد كان صنف جميزة ٩ الأكثر تحملاً لارتفاع درجة الحرارة، يليه صنف سخا ٩٣ بنسبة انخفاض قدرت بنحو (٤١ و ٥٣، ٦٦) % على التوالي.

٣. أظهرت النتائج أن ارتفاع درجة الحرارة إلى ٣٥ °م لمدة عشرة أيام أدت إلى زيادة محتوى البادرات من البرولين بشكل عام مقارنة بالبادرات التى تم تتميتها عند درجة حرارة ٢٥ °م، بحيث كان متوسط كمية البرولين لصنف جميزة ٩ و يليه صنف جميزة ١٦٨ (١.٨٢٤، ١.٧٤٧) ميكرو مول/ جم على التوالي بينما سجل صنف مصر ٢ أقل قيمة لمحتوى البرولين (٠، ٨٣٣) ميكرو مول/ جم. كما أوضحت النتائج أن كل من أصناف جميزة ١٦٨، سخا ٩٣ وجميزة ٩ عند درجة حرارة ٣٥ °م قد أحتوى أكثر من ضعف (< ٢٠٠) % محتوى البرولين عند ٢٥ °م. وبصفة عامة قد وجد أن قيمة التغير النسبى لمحتوى البرولين فى الاصناف المتحملة لارتفاع درجة الحرارة أعلى من الأصناف الحساسة لارتفاع درجة الحرارة تحت تأثير الإجهاد الحرارى. كما و سجل صنف سخا ٩٣ أعلى قيمة للتغير النسبى لمحتوى البرولين والتي قدرت (٢٤٦) %.

٤. تبين وجود ارتباط إيجابي قوي فى الاصناف المتحملة لارتفاع درجة الحرارة وبين كل من (الإصابة النسبية للغشاء الخلوى و محتوى البرولين النسبى) و (الإصابة النسبية للغشاء الخلوى و المحتوى النسبى للكلوروفيل) وقدره (٠، ٧٢٨)، (٠، ٥١) على التوالي، بينما وجد ارتباط سلبى قوى بين (محتوى البرولين النسبى و محتوى الكلوروفيل النسبى) وقدره (٠، ٩٦٦ -). وعلى الجانب الآخر فقد ظهر ارتباط سلبى بين كل من (الإصابة النسبية للغشاء الخلوى و محتوى البرولين النسبى)، (محتوى البرولين النسبى و محتوى الكلوروفيل النسبى) و (محتوى البرولين النسبى و محتوى الكلوروفيل النسبى) وقدره (٠، ٢١٤)، (٠، ٧٦٤) و (٠، ٣٥٢) على التوالي بالنسبة للأصناف الحساسة للحرارة.

بشكل عام، واستناداً على الدراسات الفسيولوجية والبيوكيميائية، فكل من الأصناف مصر ١ وسدس ١٢ و مصر ٢ تعتبر أصنافاً حساسة لارتفاع درجة الحرارة، وفي المقابل الأصناف جميزة ١٦٨ وسخا ٩٣ و جميزة ٩ تعتبر أصنافاً متحملة لارتفاع درجة الحرارة. ويمكن القول أنه بصفة عامة يزداد محتوى البرولين مع إنخفاض محتوى الكلوروفيل عند زيادة الإصابة النسبية للغشاء الخلوى تحت تأثير ارتفاع درجة الحرارة.

٢- الدراسة الجزيئية والوراثية:

تم عمل ثلاث مجموعات من أصناف القمح تحت الدراسة: المجموعة الأولى: إنبات أصناف القمح المختلفة لمدة ١٤ يوماً عند ٢٥ °م كمجموعة ضابطة (كنترول). المجموعة الثانية: بعد نمو البادرات لمدة ١٤ يوماً عند ٢٥ °م تعرض البادرات لدرجة حرارة ٣٥ °م لمدة ٢٤ ساعة (أقلمة) و بعد ذلك ترفع درجة الحرارة إلى ٤٢ °م لمدة ساعتين. المجموعة الثالثة: تم تعريض البادرات بعد نموها لمدة ١٤ يوماً عند ٢٥ °م مباشرة لدرجة حرارة ٤٢ °م لمدة ساعتين (بدون أقلمة). ويمكن تلخيص النتائج التى تم الوصول إليها فى النقاط التالية:

أولاً: التحديد الكمي و الوقت الحقيقي لتفاعل البلمرة المتسلسل (Quantative Real-time PCR)

١- تم التأكد من وجود جين بروتين الصدمة الحرارية (HSP101) فى جميع أصناف القمح تحت الدراسة سواء كانت معاملة أو غير معاملة بالإجهاد الحرارى.

٢- أظهرت نتائج المعاملة الحرارية المباشرة (بدون أقلمة) أعلى تعبيراً جينياً لجين HSP101 فى صنف سخا ٩٣ يليه كل من صنفى مصر ١ و جميزة ٩ (١٩٢، ٧)، (١٤٣، ١)، (١٢٦، ٢) % على التوالي.

٣- المعاملة الحرارية في وجود الأقلمة أن التعبير الجيني جين HSP101 في صنف جميزة ٩ كان الأعلى و يليه صنف مصر ١ بنسبة قدرها (٤٢٩.٧، ٢٢٠.٣)٪ على التوالي. بينما أظهر صنف سدس ١٢ أقل نسبة للتعبير الجيني (٦.٦)٪ تحت نفس الظروف التجريبية.

٤- لقد سجلت البادرات التي تم تعريضها للأجهاد الحراري تحت ظروف الأقلمة متوسط كلي للتعبير الجيني قدره (١٨١.٥)٪ بالمقارنة بالبادرات المعاملة بالحرارة مباشرة (١١٣.٧)٪. وعلاوة على ذلك، فإن المعاملة الحرارية بعد الأقلمة أدت الى زيادة التعبير الجيني لجين HSP101 بنحو (٥٩.٦)٪ أعلى من المعاملة الحرارية المباشرة بدون أقلمة.

ثانياً. اكتشاف النيوكليوتيدات الفردية المتباينة:

أ- الطريقة الحسابية (اليدوية) باستخدام برنامج @DNAMAN : لقد أظهر نتائج النيوكليوتيدات الخاصة بجين HSP101 لصنف سدس ١٢ عدد ١١ أحلال قاعدى متكافىء (Transition) من (A) إلى (G) بنسبة ٥٥٪ وعدد ٥ أحلال قاعدى متعكس غير متكافىء (Transversion) بنسبة ٢٥٪ بالإضافة لحذف (Deletion) ٢ قاعدة (A) بنسبة ١٠٪ من إجمالي عدد الطفرات الكلية. وتبين أن تكرار الاحلال القاعدى يمثل ٩٤ / ١ قاعدة بينما يمثل تكرار الفقد القاعدى ١ / ٨٩٨ قاعدة. أما بالنسبة لتتابع النيوكليوتيدات الخاص بجين (HSP101) لصنف جميزة ٩ فلم يتم العثور على أى نوع من النيوكليوتيدات الفردية المتباينة (SNP) باستثناء فقد قاعدتين G وتمثل نسبة ١٠٪ من إجمالي عدد الطفرات.

ب- الطريقة الآلية باستخدام قاعدة بيانات SNP Finder: تم العثور على عدد ٨ احلال قاعدى متكافىء من (A) إلى (G) ، ٢ احلال نيكلوتيدى غير متكافىء من (A) إلى (T) وتم العثور على ٣ فقد أو إضافة (InDels) في تتابع النيوكليوتيدات الخاص بجين HSP101 للصنف سدس ١٢. على الجانب الآخر لم يتم العثور على أى نوع من (SNP) في تتابع النيوكليوتيدات الخاص بجين HSP101 للصنف جميزة ٩. وبصفة عامة، فإن إجمالي الاحلال المتكافىء كان ضعف كل من الاحلال الغير متكافىء و الفقد أو الإضافة النيوكليوتيدات.

وبشكل عام، يمكن القول أن نتائج الطريقة اليدوية قد أتفقت مع نتائج الطريقة الآلية وعلاوة على ذلك ، فإن الاحلا المتكافىء من (A) إلى (G) كان الأكثر شيوعاً و يمثل ٥٠٪ من إجمالي الطفرات في تتابع النيوكليوتيدات الخاص بجين HSP101 للصنف سدس ١٢ والتي قدر طولها الإجمالي ١٧٩٥ قاعدة.

ثالثاً. دراسة التباين الوراثى:

باستخدام برنامج MEGA6.06 لعمل شجرة التقارب الوراثى بين تتابعات {AF174433.1_HSP101c} و {AF083344.2_HSP101} و {AF097363.1_Hsp101b} مع كل من { تتابع النيوكليوتيدات الخاصة بجين HSP101 لصنف جميزة ٩ (Gemmeiza9_HSP101) و صنف سدس ١٢ (Sids12_HSp101) } ولقد تبين أن درجة التقارب الوراثى بين (AF174433.1_HSP101c) و (Gemmeiza9_HSP101) وصلت إلى ١٠٠٪ بينما كان التقارب الوراثى بين (AF174433.1_HSP101c) و (Sids12_HSp101) كان ٩٩٪ (حيث تمثل نسبة ١٪ نسبة التباين الوراثى) نتيجة وجود polymorphism فى تتابع الجين HSP101c لهذا الصنف.

رابعاً. التنبؤ بتسلسل الأحماض الأمينية:

أ- باستخدام برنامج MEGA6.06 وجد أن نسبة التشابه بين محتوى الأحماض الأمينية لبروتين (HSP101) الخاص بصنف سدس ١٢ و بروتين (AF174433.1_HSP101c) كانت ٩٧.٩٪ ، بينما وصلت نسبة التشابه بين محتوى الأحماض الأمينية لبروتين HSP101 الخاص بصنف جميزة ٩ و بروتين HSP101c إلى ٩٩٪.

ب. وبالكشف عن تغييرات الأحماض الأمينية باستخدام برنامج DNAMAN ظهر عدم وجود أى تغييرات بالأحماض الأمينية الخاصة بجين HSP101 للصفة مميزة ٩، بينما وجد تغير لعدد ١٠ أحماض أمينية فى بروتين HSP101 للصفة سدس ١٢ كما وجد إنخفاض فى نسبة الأحماض الأمينية الجلوتاميك ، الأيسوليوسين و الليسين بنسبة ٢٥.٦٪، ٣٥٪ و ٧٥٪ على التوالي. وكان هناك ارتفاع فى نسبة الأحماض الأمينية الفالين، الجليسين، الميثيونين ، الفيل ألانين ، اللوسين بنسبة ١٤.٣٧٪، ١٧٪، ١٧، ٢٩.٨٪ و ٣٩٪ على التوالي.

ومن النتائج السابقة يمكن أستخلاص أنه استنادا الى الدراسات الفسيولوجية والبيوكيميائية ، فإن كل من صنف مصر ١ وسدس ١٢ و مصر ٢ تعتبر أصنافا حساسة لارتفاع درجة الحرارة، بينما الاصناف جيزة ١٦٨ وسخا ٩٣ و جيزة ٩ تعتبر أصنافا متحملة لارتفاع درجة الحرارة. واستنادا الى الدراسة الجزيئية الوراثية ، أظهر الصنف جيزة ٩ هو الصنف الأكثر تحملا لارتفاع درجات الحرارة (أعلى تعبير جينى لجين HSP101 فى المعاملتين الحراريتين للأقلمة وبدو أقلمة) ، بينما الصنف سدس ١٢ هو الصنف الأكثر حساسية لارتفاع درجة الحرارة (الأكثر انخفاضا فى التعبير الجينى لكلا المعاملتين الحراريتين نتج عن التغيرات فى تتابع النيكلوتيدات (Sids12_HSp101) تغييرات فعالة فى تتابع الأحماض الأمينية لبروتين HSP101. ولذلك نوصى بأهمية دراسة الجينات التى لها علاقة بتحمل الإجهاد الحرارى لاصناف القمح المصرية وعمل خريطة جينية لها بحيث تساهم فى تحسين السلالات والاصناف بما يتلائم مع توقعات ارتفاع درجة الحرارة مستقبلا و إجراء دراسات مستفيضة على علاقة الأحماض الامينية المختلفة بمدى قدرة تحمل الاصناف الموصى بها لارتفاع درجات الحرارة.

لجنة الإشراف

..... أ.د. أشجان السيد عبد المجيد أبو جبل
استاذ الوراثة- قسم النبات الزراعى - كلية الزراعة (سابا باشا)
جامعة الاسكندرية (مشرفا رئيسيا)

..... أ.د. ياسر محمد أحمد محمد مبروك
استاذ ورئيس قسم الوراثة- كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية

..... د. نادر رجب عبد السلام
أستاذ مساعد الوراثة - قسم النبات الزراعى - كلية الزراعة
(سابا باشا)- جامعة الاسكندرية



جامعة الإسكندرية
كلية الزراعة - سابا باشا
قسم النبات الزراعى

أكتشاف الأشكال المظهرية المتعددة للنيكلوتيدات الفردية الخاصة ببعض جينات تحمل الضغوط اللاحيوية لبعض أصناف القمح المصرية

مقدمة من

كريم محمد محمد عوض طبل

للحصول علي درجة
الماجستير في العلوم الزراعية
(الوراثة)
قسم النبات الزراعى

موافقون

لجنة الحكم علي الرسالة :

.....

أ.د. السيد السيد حافظ

أستاذ ورئيس قسم أمراض النبات الجزيئية - معهد بحوث وزراعة
الأراضى القاحلة - مدينة الأبحاث العلمية والتطبيقات التكنولوجية

.....

أ.د. أحمد السيد محمد خالد

أستاذ الوراثة - قسم النبات الزراعى - كلية الزراعة (سابا باشا) -
جامعة الاسكندرية

.....

أ.د. أشجان السيد عبد المجيد أبو جبل

أستاذ الوراثة - قسم النبات الزراعى - كلية الزراعة (سابا باشا) -
جامعة الاسكندرية

.....

أ.د. ياسر محمد أحمد مبروك

أستاذ و رئيس قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية



جامعة الإسكندرية
كلية الزراعة - سببا باشا
قسم النبات الزراعى

أكتشاف الأشكال المظهرية المتعددة للنيكلوتيدات الفردية الخاصة ببعض جينات تحمل الضغوط اللاحيوية لبعض أصناف القمح المصرية

رسالة علمية مقدمة إستيفاءً لمتطلبات منح درجة

الماجستير في العلوم الزراعية

(الوراثة)

مقدمة من

كريم محمد محمد عوض طبل