# CHAPTER 7

# ARABIC SUMMARY

obeikandl.com

# الملخص العربى

obeikandl.com

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

يحتل لقمح (*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 $^{o}$ م والقمح من المحاصيل التى تتعرض للإجهاد الحرارى المزمن خلال المراحل الفيسيولوجية المختلفة للنمومما يوثر على جودة وكمية الانتاج . ولقد قدرت نماذج المناخ العالمية زيادة متوسط درجة الحرارة ما بين ١,٨ و ٥,٨ $^{o}$ 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 وتتنبأ الدراسات المناخية بزيادة متوسط درجة الحرارة ١,٤ درجة مئوية و ٢,٥ درجة مئوية بحلول عام ٢٠٥٠ و٢١٠٠ مما قد يتسبب فى انخفاض إنتاجية أهم محصولين في مصر: القمح و الذرة بنسبة ١٥٪ و ١٩٪ على التوالي بحلول عام ٢٠٥٠ مع يؤدى الى زيادة انخفاض الأمن الغذائي وانتشار الفقر. يستهلك القمح في الغالب بالدول النامية بالمنطقة الاستوائية وشبه الاستوائية المكتظة بالسكان ويصل الإنتاج المحلي من القمح في مصر حوالي ٨ مليون طن وهو يغطي أقل من ٦٠٪ من الاستهلاك المحلي و لذلك لا تزال مصر أكبر مستورد للقمح في العالم وفقا لتقارير منظمة الفاو ٢٠١٣ و يقدر متطلبات الحبوب في 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 الفيسيولوجية متمثلا فى التمثيل الغذائي، وسيولة الأغشية الخلوية ودرجة تجمع البروتين و شكل الهيكل الخلوي. وتقوم الخلية بانتاج بروتينات الصدمة الحرارية حتى تتوائم 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 في احداث إصابة أو أضرار لا رجعة فيها، وهو ما يسمى عموما "الإجهاد الحراري" ، ولذلك نحن بحاجة إلى فهم كيفية استجابة المحاصيل للتغيرات فى درجات الحرارة المرتفعة وكيف يمكن تحسينها وانتاج أصناف جديدة من القمح تتحمل التغيرات المناخية فى المستقبل. وتلعب بروتينات الصدمة الحرارية (HSPs) دورا أساسيا في 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 و هو أحد بروتينات الصدمة الحرارية و التى تعمل معا بشكل تعاونى فى أذابة التجمعات البروتينة والتى تتشكل استجابة للإجهاد الحراري.

والهدف من هذه الدراسة هو تقييم درجة تحمل ستة أصناف مصرية من قمح الخبز (مصر١ ، سدس١٢، مصر٢ ،جيزة ١٦٨، سخا ٩٣ و جميزة ٩) لإرتفاع درجة الحرارة. يتم التقييم من خلال القياسات الفسيولوجية والبيوكيميائية بما في ذلك درجة صمود الغشاء الخلوى، محتوى الكلوروفيل ومحتوى البرولين لأوراق البادرات، أما على المستوى الجزيئي فسوف يتم أستخدام تكنيك التحديد الكمى و الوقت الحقيقي لتفاعل النسخ العكسي البلمرة المتسلسل (Quantitative Real-time PCR) لقياس كمية التعبير الجينى HSP101 تحت ظروف الإجهاد الحراري المختلفة ثم تحديد النيكلوتيدات الفردية المتباينة (SNPs) فى جين HSP101c الخاص بقمح الخبز المصري.

## 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$^{o}$ م وثم تركها كمجموعة ضابطة (كنترول). تم تعريض مجموعة أخرى من البادرات لدرجة حرارة ٣٥$^{o}$ م لمدة ٤٨ ساعة وذلك لدراسة تأثير الإجهاد الحراري.

١. أظهرت نتائج دراسة إختبار درجة تحمل الغشاء الخلوى للحرارة (cell membrane thermostability) أن أصناف مصر١، سدس١٢، مصر٢ كانت الأصناف الأكثر حساسية حيث سجلت نسبة اصابة حوالى (٨٣، ٧٨، ٧٥) %على التوالي بينما أظهرت أصناف جميزة ٩ وسخا ٩٣ نسبة اصابة (٤٩، ٤٦)% على التوالى ( نسبة الإصابة Relative injury أكثر من ٥٠% تعتبر حساسة واقل من ٥٠% تعتبر متحملة).

٢. صنف مصر (٢) كان الأكثر إنخفاضا فى إجمالي محتوى الكلوروفيل نتيجة للإجهاد الحراري (٨٧,٦٪)، يليه صنف مصر١ ، الجيزة ١٦٨ ، سددس ١٢ بنسبة (٧٦,٨٪، ٧٥,٩٪ و ٦١,٦٪) على التوالي. ومن ناحية أخرى فقد كان صنف جميزة ٩ الأكثر تحملا لإرتفاع 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 تنميتها عند درجة حرارة ٢٥°م ، بحيث كان متوسط كمية البرولين لصنف جميزة ٩ و يليه صنف جيزة 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 جيزة 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 لإرتفاع درجة الحرارة تحت تأثير الإجهاد الحرارى. كما و سجل صنف سخا ٩٣ أعلى قيمة للتغير النسبى لمحتوى البرولين والتى 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 التوالى، بينما وجد ارتباط سلبي قوى بين (محتوى البرولين النسبي ومحتوى الكلوروفيل النسبي) وقدره ( - ٠,٩٦٦). وعلى الجانب الأخر فقد ظهر ارتباط سلبى بين كل من (الإصابة النسبية للغشاء الخلوى و محتوى البرولين النسبى) ، (محتوى البرولين النسبي ومحتوى الكلوروفيل النسبي) و (محتوى البرولين النسبي ومحتوى الكلوروفيل النسبي) و قدرة (٠,٢١٤)، (٠,٧٦٤) و (٠,٣٥٢) على التوالى بالنسبة للأصناف الحساسة للحرارة.

**بشكل عام**، واستنادا على الدراسات الفسيولوجية والبيوكيميائية ، فكل من الاصناف مصر١ وسدس١٢ و مصر٢ تعتبر أصنافا حساسة لارتفاع درجة الحرارة، وفي المقابل الاصناف جيزة ١٦٨ وسخا٩٣ و جميزة ٩ تعتبر أصنافا متحملة لإرتفاع درجة الحرارة. و يمكن القول أنه بصفة عامة يزداد محتوى البرولين مع إنخفاض محتوى الكلوروفيل عند زيادة الإصابة النسبية للغشاء الخلوى تحت تأثير إرتفاع درجة الحرارة.

## ٢- الدراسة الجزيئية والوراثية:

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

### أولا: التحديد الكمى و الوقت الحقيقى 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 او غير معاملة بالإجهاد الحرارى.

٢- أظهرت نتائج المعاملة الحرارية المباشرة (بدون أقلمة) أعلى تعبيرا جينيا لجين HSP101 فى صنف سخا ٩٣ يليه كل من صنفى مصر١ و جميزة ٩ (١٩٢.٧، ١٤٣.١، ١٢٦.٢) ٪ على التوالي.

٣- المعاملة الحرارية فى وجود الأقلمة أن التعبير الجينى جين HSP101 فى صنف جميزة ٩ كان الأعلى و يليه صنف مصر١ بنسبة قدرها (٤٢٩.٧، ٢٢٠.٣)٪ على التوالى. بينما أظهر صنف سدس ١٢ أقل نسبة للتعبير الجينى(٦.٦)٪ تحت نفس الظروف التجريبية.

٤- لقد سجلت البادرات التى تم تعريضها للأجهاد الحرارى تحت ظروف الأقلمة متوسط كلي للتعبيرالجينى قدره (١٨١.٥٪) بالمقارنة بالبادرات المعالمة بالحرارة مباشرة (١١٣.٧٪).). وعلاوة على ذلك، فإن المعاملة الحرارية بعد الأقلمة ادت الى زيادة التعبير الجينى لجين HSP101 بنحو (٥٩,٦٪) أعلى من المعاملة الحرارية المباشرة بدون أقلمة.

**ثانيا. اكتشاف النيوكلوتيدات الفردية المتباينة:**

أ- **الطريقة الحسابية (اليديوية) باستخدام برنامج DNAMAN®** : لقد أظهر تتابع النيكلوتيدات الخاصة بجين HSP101 لصنف سدس١٢ عدد ١١ أحلال قاعدى متكافىء (Transition) من (A) إلى(G) بنسبة ٥٥٪ وعدد ٥ أحلال قاعدى متعاكس غير متكافىء(Transversion) بنسبة ٢٥٪ بالإضافة لحذف (Deletion) ٢ قاعدة (A) بنسبة ١٠٪ من إجمالي عدد الطفرات الكلية. وتبين أن تكرار الاحلال القاعدى يمثل ١/ ٩٤ قاعدة بينما يمثل تكرار الفقد القاعدى ١ / ٨٩٨ قاعدة. أما بالنسبة لتتابع النيكوتيدات الخاص بجين (HSP101) لصنف جميزة ٩ فلم يتم العثور على أى نوع من النيكلوتيدات الفردية المتباينة (SNP) باستثناء فقد قاعدتين G وتمثل نسبة 10 ٪ من إجمالي عدد الطفرات.

ب- **الطريقة الآليه بإستخدام 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 النيكلوتيدات الخاص بجين HSP101 للصنف سدس ١٢. على الجانب الأخر لم يتم العثور على أي نوع من (SNP) في تتابع النيكلوتيدات الخاص بجين HSP101 للصنف جميزة ٩. و بصفة عامة، فإن إجمالى الاحلال المتكافىء كان ضعف كل من الاحلال الغير متكافىء و الفقد أو الإضافة النيكلوتيدات.

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

**ثالثا. دراسة التباعد الوراثى:**

بإستخدام برنامج MEGA6.06 لعمل شجرة التقارب الوراثى بين تتابعات {*(AF174433.1_HSP101c)* و *(AF083344.2_HSP101)* و*(AF097363.1_Hsp101*b)} مع كل من { تتابع النيكلوتيدات الخاصة بجين HSP101 لصنف جميزة٩(Gemmeiza9_HSP101) و صنف سدس١٢ (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 التباعد الوراثى ) نتيجة وجود polymorphism فى تتابع الجين HSP101c لهذا الصنف.

**رابعا. التنبؤ بتسلسل الأحماض الأمينية:**

أ- بإستخدام برنامج MEGA6.06 وجد أن نسبة التشابهة بين محتوى الأحماض الأمينية لبروتين (HSP101) الخاص بصنف سدس١٢ و بروتين (*AF174433.1_HSP101c* ) كانت ٩٧.٩٪ ، بينما وصلت نسبة التشابهة بين محتوى الأحماض الأمينية لبروتين HSP101 الخاص بصنف جميزة٩ و بروتينHSP101c الى ٩٩%.

ب. وبالكشف عن تغييرات الأحماض الأمينية بإستخدام برنامج DNAMAN ظهر عدم وجود أى تغييرات بالأحماض الأمينية الخاصة بجين HSP101 للصنف جميزة٩، بينما وجد تغير لعدد ١٠ أحماض أمينية فى بروتين HSP101 للصنف سدس١٢ كما وجد إنخفاض فى نسبة الاحماض الأمينية الجلوتاميك ، الآيسوليوسين و الليسين بنسبة ٢٥.٦٪، ٣٥٪ و ٧٥٪ على التوالي. وكان هناك أرتفاع فى نسبة الأحماض الأمينية الفالين، الجليسين، الميثيونين ، الفنيل ألانين ،اللويسين 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 مصر١ وسدس١٢ و مصر٢ تعتبر أصنافا حساسة لارتفاع درجة الحرارة، بينما الاصناف جيزة ١٦٨ وسخا٩٣ و جميزة ٩ تعتبر أصنافا متحملة لإرتفاع درجة الحرارة. واستنادا الى الدراسة الجزيئية الوراثية ،أظهر الصنف جميزة ٩ هو الصنف الاكثر تحملا لإرتفاع درجات الحرارة ( أعلى تعبير جينى لجين HSP101 في المعاملتين الحراريتين للأقلمة وبدو أقلمة) ، بينما الصنف سدس١٢ هو الصنف الاكثر حساسية لإرتفاع درجة الحرارة (الأكثر انخفاضا فى التعبير الجينى لكلا المعاملتيين الحراريتين نتج عن التغييرات فى تتابع النيكلوتيدات (Sids12_HSp101) تغييرات فعالة في 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 الاحماض الامينية المختلفة بمدى قدرة تحمل الاصناف الموصى بها لارتفاع درجات الحرارة.

obeikandl.com

# 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

obeikandl.com

جامعة الأسكندرية
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**

**لجنةالحكم علي الرسالة :** **موافقــون**

**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

obeikandi.com

جامعة الأسكندرية
كلية الزراعة– سابا 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

٢٠١٤

obeikandl.com