**الجمهورية العربية السورية**

**وزارة التعليم العالي**

**جامعة البعث**

**كلية الهندسة الزراعية**

**قسم المحاصيل الحقلية**

**أثر الإجهاد الجفافي في بعض طرز القمح باستخدام المؤشرات البيوكيميائية والجزيئية**

**The Effect Of Drought Stress On Some Wheat Genotypes Using Biochemical And Molecular Indicators**

**دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية**

**قسم المحاصيل الحقلية**

**إعداد**

**أمينه طنبري**

**بإشراف**

**د. لينا النداف (مشرفاً) د. سلام لاوند (مشرفاً مشاركاً)**

تقنيات حيوية وبيولوجيا جزيئية بيولوجيا جزيئية نباتية

مدرس في قسم المحاصيل الحقلية أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية

جامعة البعث جامعة دمشق

**2022 م / 1444هـ**

**تصريح**

قدم هذا البحث لنيل درجة الماجستير في علوم المحاصيل الحقلية في كلية الهندسة الزراعية بجامعة البعث تحت عنوان أثر الإجهاد الجفافي في بعض طرز القمح باستخدام المؤشرات البيوكيميائية والجزيئية.

إن هذا البحث لم يسبق أن قبل لأي شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

**المرشحة**

**م. أمينه رياض طنبري**

**DECLARATION**

This work has been submitted for the degree Master in the field crops department, faculty of agriculture engineering, university of Albaath. Under the following name: The Effect Of Drought Stress On Some Wheat Genotypes Using Biochemical And Molecular Indicators.

It is thereby declared that this work has not been accepted for any degree, and it has not been submitted for any other degree.

**Canadidate**

**Amina Read Tonbary**

**شهادة**

نشهد بأن هذا العمل الموصوف في هذه الرسالة هو محصلة جهد شخصي قامت به المرشحة أمينه رياض طنبري تحت إشراف الدكتورة لينا النداف من قسم المحاصيل الحقلية في كلية الهندسة الزراعية بجامعة البعث والدكنورة سلام لاوند من قسم المحاصيل الحقلية في جامعة دمشق, وإن أية معلومات أو طرائق أو نتائج أخرى ذكرت في الرسالة قد نسبت إلى مصادرها ومؤلفيها بوضوح في النص وفي قائمة المراجع.

**المشرفون**

**الدكتورة لينا النداف الدكتورة سلام لاوند**

**CERTIFICATION**

It is thereby certified that the work describes in this thesis is the result of the author owns Amina Read Tonbary investigation under supervision of Dr. Lina Al-Naddaf, department of field crops, faculty of agriculture engineering, Al baath university and Dr. Slam Lauand, department of field crops, faculty of agriculture engineering, Damascus university, and references to other research work has been duly acknowledge in this text.

**Supervisors**

**Dr. Lina Al-Naddaf Dr. Slam Lauand**

**الفهرس**

**الملخص:**

1. **المقدمة (Introduction):**

تُعدُّ محاصيل الحبوب الأهمّ زراعياً على مستوى العالم، حيث تُؤمن 70% من غذاء سكان العالم، ويشكَّل محصولا القمح Wheat والأرز Rice ما يعادل 50 % من الإنتاج العالمي (Lookhart and Bean, 2000)، يتبع القمح Wheat الجنس *Triticum* من العائلة النجيلية (*Gramineace*) (Kent and Evers, 1994), ويعد من أقدم الأنواع المحصولية التي زرعت منذ ما يزيد عن 8000 سنة، وذلك في مناطق مختلفة من العالم في أوروبا وغربي آسيا وشمالي أفريقيا (Dixon *et al*., 2009).البحث

يحتل القمح من حيث الإنتاج العالمي المرتبة الثانية في قائمة محاصيل الحبوب بعد محصول الذرة الصفراء Corn (*Zea mays L*) ، حيث أنتج 773 مليون طناً من القمح للموسم الزراعي2020 -2021، ويشكل إنتاج الصين، الهند، روسيا, والولايات المتحدة أكثر من ربع الإنتاج العالمي. (International Grain Council, 2021).

بلغ إجمالي إنتاج الحبوب في المنطقة العربية حوالي (57.59) مليون طن في عام 2019م. شكل إنتاج القمح منها ما يعادل 49.43%, أي حوالي (28.47) مليون طن, والإنتاجية (2.71) طن للهكتار, كما يأتي بالمرتبة الأولى من حيث المساحة المزروعة, حيث شكلت مساحته نحو (33.70%) من إجمالي المساحة المزروعة بالحبوب في المنطقة العربية لعام 2019م, وتتركز زراعة القمح في كل من مصر والمغرب والعراق والجزائر وسوريا وتونس, حيث ساهمت هذه الدول مجتمعة بنحو (90%) من إجمالي إنتاج المنطقة العربية من هذا المحصول. (المنظمة العربية للتنمية الزراعية 2019).

بلغت المساحة المزروعة بالقمح في القطر العربي السوري 1350538 هكتاراً، والإنتاج 2848472 طناً، والإنتاجية 2109 كغ.هكتار-1، احتل القمح القاسي من المساحة المزروعة ما يعادل 744123 هكتاراً، وبلغ الإنتاج 1672849 طناً، والإنتاجية 2248 كغ.هكتار-1، في حين بلغت المساحة المزروعة بالقمح الطري 606415 هكتاراً، والإنتاج 1175622 طناً، والإنتاجية 1939 كغ.هكتار-1. تتركز زراعة القمح القاسي والطري في سورية في المناطق الشرقية والشمالية الشرقية، حيث تحتل محافظة الحسكة المرتبة الأولى من حيث المساحة المزروعة، تليها محافظة حلب، ثم محافظة الرقة (المجموعة الإحصائية الزراعية 2020). هذا وقد تراجعت إنتاجية محصول القمح من سنة لأخرى بسبب العديد من العوامل, لعل أهم هذه العوامل هو قلة معدلات الهطول المطري السنوية، وعدم انتظام توزع الأمطار خلال موسم النمو (Osman *et al*., 2010), لذلك كان لابد من العمل على تحسين تحمل هذا المحصول الهام تحت ظروف الإجهاد الجفافي، إما عن طريق التوسع الأفقي من خلال زيادة المساحة المزروعة، وهذا غير ممكن بسبب تراجع مساحة الأراضي الصالحة للزراعة نتيجة لتملح الموارد المائية العذبة وندرتها، أو زيادة الإنتاج بشكل رأسي، وذلك من خلال زيادة الإنتاج في وحدة المساحة المزروعة، إلا أن تناقص الموارد المائية يتحدى هذه الفكرة أيضاً (Kang *et al*., 2008) فكان الحل الأمثل للتغلب على مشكلة الجفاف من وجهة نظر بعض الباحثين, هو العمل على انتخاب الطرز الوراثية ذات الطاقة الإنتاجية المرتفعة تحت ظروف الزراعة المطرية، وتحديد حزمة التقانات الزراعية المناسبة التي تظهر الطاقة الإنتاجية الوراثية الكامنة Potential yield لهذه الطرز (Chahal and Gosal, 2002). في حين أوضح باحثون آخرون أن التربية للوصول إلى غلة أعلى مطلوبة في البيئات متوسطة الإجهادات, أما في حالات الإجهادات الحادة تكون الأصناف ذات الغلة الأقل مترافقة مع تحمل عالٍ للجفاف. (Voltas *et al*., 1999; Panthuwan *et al*., 2002).

**الدراسة المرجعية :(Re**v**iew of Literature)**

تعتمد دراسة تأثير الجفاف في النبات على تعريض النبات إلى بيئات ذات رطوبة منخفضة نسبياً أو بتعريض جذور النباتات إلى بيئة ذات جهد مائي منخفض, ويجري ذلك من خلال التحكم في كمية مياه الري, أو عدد مرات الري, أو باستخدام بعض المركبات العضوية لخفض جهد ماء التربة. (Skribanek & Tomcsányi, 2008, Dami & Hughes, 1996) نادراً ما يتم استخدام إجهاد الجفاف الفعلي للتربة, لأن مكونات التربة معقدة للغاية, ومن الصعب التحكم في جميع مكونات التربة. بالإضافة إلى ذلك, من الصعب للغاية التمييز بين الإجهاد الجفافي والضغوط غير الحيوية (Abiotic stress) الأخرى في نظام التربة. ومع ذلك فمن المهم لتجربة الإجهاد الجفافي إنشاء حالة مستقرة وخاضعة للرقابة (Zhang *et al*., 2004). لذلك فقد لجأ مربي النبات, إلى استخدام بعض المركبات الكيميائية التي تحث على الجفاف ضمن ظروف المخبر, ومن هذه المركبات, البولي إيتيلين غليكول PEG6000 التي تستخدم بكثرة من أجل غربلة أصناف القمح لتحمل الإجهاد الجفافي عند المراحل المبكرة للنمو, كونها مركبات غير متشردة, ولا تدخل عبر غلاف البذرة وتبقي جهد الوسط ثابت طيلة فترة التجربة (Valifard *et al*., 2012).

يلجأ النبات في ظروف الإجهاد الجفافي, إما للتهرب أو التأقلم, فالتهرب هو وسيلة يتبعها النبات لإلغاء أو التقليل من تأثيرات الإجهاد الجفافي, خلال مراحل تطوره خاصة الأصناف الحساسة لنقص المياه, ويكون ذلك بالتبكير في الإزهار والنضج خارج فترات الإجهاد الجفافي (يخلف, 2001), أما التأقلم فهو قدرة النبات على النمو وإعطاء مردود في المناطق التي تعاني من نقص المياه (Turner, 1979). ولعل من أهم آليات التأقلم, التنظيم الأسموزي الذي يعد إجراء بيولوجي يحمي العضو من تأثير نقص المياه, وذلك بتخفيض الضغط المائي والإبقاء على الضغط الانتباجي (Turner, 1986) ,عن طريق تراكم العديد من المركبات في السيتوبلازم, حيث تقوم هذه المركبات بالحفاظ على انتباج الخلايا (Anjum *et al*., 2011). ومن هذه المركبات السكريات الذوابة والأحماض العضوية وبعض الشوارد كالصوديوم والبوتاسيوم وغيرها (Farooq *et al*., 2009).

يعد اختيار الصفات الفيزيولوجية المتعلقة بتحمل الجفاف أمراً ضروريا لأنه يمكن أن يزيد من كفاءة الاختيار(Ciucặ *et al*., 2010), ومن أهم هذه الصفات, صفة تراكم البرولين (Anjum *et al*., 2011).

البرولين هو أحد الأحماض الأمينية الهامة في النباتات, حيث تقوم باصطناعه كرد فعل أو كنوع من التأقلم ضد الجفاف, ويتركز البرولين في جميع أجزاء النبات وبكمية مرتفعة في الأوراق (Palfi *et al*., 1973), حيث يمثل في بعض الحالات 1% من الوزن الجاف للنبات (Hsiao, 1973). وقد لوحظ تراكم البرولين لأول مرة في أنسجة نباتات الشوفان الذابلة عام 1954, حيث كان تراكمه في هذه الأنسجة بكميات تفوق ما يمكن أن يكون ناتجاً عن التحلل البروتيني (Rayapati & Stewart, 1991).

يلعب البرولين دوراً مهماً في آلية تحمل الإجهاد المائي في النباتات نظراً لقدرته على مقاومة الإجهاد التأكسدي, وتعتبر هذه الاستراتيجية الأكثر أهمية في النباتات للتغلب على آثار نقص المياه (Vendruscolo *et al*., 2007). كما أنه يخفف من سمية بعض المركبات ويتفاعل مع بقايا بعض البروتينات (Nanjo *et al*., 1999; Yang & Jorgensen, 2011)

انقسم الباحثون في تحليلهم لتراكم البرولين إلى رأيين, فمنهم من قال أن الأصناف الأكثر مقاومة للجفاف هي الأصناف التي تجمع البرولين بكميات كبيرة (Stewart, 1983; Kanffman, 1972), ومنهم من قال العكس أي أن الأصناف الأكثر مقاومة للجفاف هي الأصناف الأقل تجميعاً للبرولين (Hanson *et al*., 1979; Fukutoka & Yamada, 1981; Hanson & Hitz, 1981). وجد الباحثون (Deora *et al*., 2001), تراكماً للبرولين في أوراق القمح المعرضة لإجهاد الجفاف مقارنة بالمروية وأرجعوا ذلك إلى أن البرولين المتراكم يعتبر نوعاً من مقاومة النبات للجفاف. في حين أقرّ (Hanson *et al*., 1977)أن تجمع البرولين في نبات الشعير يحتمل أن يكون ناتج من ردة فعله للجفاف فقط وليس لمقاومة الجفاف.

يتباين محتوى البرولين المتجمع باختلاف الأجناس, والأنواع النباتية ضمن الجنس الواحد, وشدة الإجهاد (Kishore *et al*., 2005) فقد توصل (Anjum *et al*., 2011) إلى أن الإجهاد الجفافي التدريجي أدى إلى تراكم البرولين في نباتات الذرة, حيث ازداد محتوى البرولين مع تقدم إجهاد الجفاف, ووصل إلى ذروته بعد 10 أيام من الإجهاد, ثم لوحظ انخفاضه بعد 15 يوم من الإجهاد وفي بحث آخر لوحظ زيادة محتوى البرولين الحر بنسبة 23.0٪ إلى 77.0٪ في الأوراق و 13.35٪ إلى 97.6٪ في الجذور من 24 ساعة إلى 48 ساعة من الإجهاد الجفافي (Hui *et al*., 2015).

من الصفات الفيزيولوجية الأخرى المتعلقة بتحمل الإجهاد الجفافي , صفة المحتوى الكلوروفيلي, حيث تقوم النباتات بتصنيع الغذاء من خلال عملية التمثيل الضوئي وتعتبر الأصبغة الخضراء الموجودة في الأوراق جهازاً ضوئيا لالتقاط الضوء (Anjum *et al*., 2011), فالكلوروفيل هو المكون الرئيسي للبلاستيدات الخضراء ومحتواه النسبي له علاقة إيجابية مع معدل التمثيل الضوئي (Nyachiro *et al*., 2001), فقد ثبت أن تعرض النباتات للجفاف يؤدي إلى تأثير كبير في محتوى الكلوروفيل نتيجة لانخفاض نمو الأوراق (Chutia & Borah, 2012).

توصلت بعض الدراسات إلى أن الإجهاد الجفافي أدى إلى انخفاض محتوى الكلوروفيل لدى النباتات, ومن هذه الدراسات دراسة تمت على عدة أصناف من عباد الشمس أدى فيها الإجهاد الجفافي إلى انخفاض كبير في محتوى الكلوروفيل a والكلوروفيل b والكلوروفيل الكلي (Manivannan *et al*., 2007). وهذا ما تم إثباته أيضاً في دراسة أخرى حيث أدى تعريض صنفين من الزيتون لتقليل الري إلى انخفاض محتوى الكلوروفيل (Guerfel *et al*., 2009), وكذلك أيضاً لدى عدة أصناف من القمح, وسجل أعلى محتوى منه عند الأصناف المتحملة فيما سجلت الأصناف الحساسة أقل محتوى (Ali akbari *et al*., 2016).

من جهة ثانية كان هناك دراسات أخرى توصلت إلى أن الإجهاد الجفافي أدى إلى زيادة محتوى الكلوروفيل, كالدراسة التي قام بها(Mafakheri *et al*., 2010) على نبات الحمص, وهذا ما يتفق أيضاً مع بحثٍ آخر تم في سلطنة عمان على صنف من القمح خضع فيها لأربعة أنظمة جفاف هي 100% و 80% و 60% و 40% كان محتوى الكلوروفيل في الأوراق (32.9 ملغ/غ) في النباتات المروية بنسبة 60 % وهو أعلى بالمقارنة مع 80 % ري حيث بلغ (28.8 ملغ/غ) (Ahmed *et al*., 2016).

كما وتختلف الأصناف في استجابتها للإجهاد, ففي دراسة تمت لمراقبة التغير في محتوى الكلوروفيل الكلي لدى نبات الأرز بعد سبعة أيام من حجب الماء وسبعة أيام أخرى من إعادة الري. أظهرت بيانات الدراسة زيادة معنوية في مستويات الكلوروفيل في بعض الطرز الوراثية بينما سجل البعض الآخر انخفاضاً ملحوظاً نتيجة الجفاف (Bashier *et al*., 2018)

هذا الاختلاف في بعض الأصناف يودي بالباحثين إلى التركيز على صفة الكلوروفيل في عمليات الانتخاب (Kolaksazov *et al*., 2014; sabbagh *et al*., 2014).

**MDA**

يمكن للنباتات في ظروف الإجهاد اللاإحيائي أن تنتج أنواع الأكسجين التفاعلية (النشطة) (ROS), (Anjum *et al*., 2011). ص419/ العمود1**قمح / أجنبي/ Drought MDA3** والتي تهاجم بشكل مباشر دهون الغشاء وتزيد من أكسدة الدهون (Maksup et al. 2014). ص2/ العمود1**قمح / أجنبي/ Drought MDA2** ، مما يسبب خلل في نظام التمثيل الغذائي في الكائنات الحية ، ولتقليل هذه الأضرار طورت النباتات مسارات مختلفة مثل زيادة المركبات المضادة للأكسدة, (RiceEvans et al. 1997). ص2/ العمود1**قمح / أجنبي/ Drought MDA2** مثل المالون داي ألدهيد MDA **[36]/2008**. . قمح/د.لينا/pone1

لتقييم آثار إجهاد الجفاف قصير المدى على بلازما نظام الغشاء في نباتات القمح البري ، تم تحديد محتويات MDA في الجذور والأوراق بشكل منفصل. أشارت النتيجة إلى أن مستويات MDA لم تتغير بشكل ملحوظ في كلا الأنسجة (الأعضاء) بعد 24 ساعة من إجهاد الجفاف. ومع ذلك ، تم زيادة مستوى MDA بمقدار 47.06٪ و 23.33٪ في الجذور و الأوراق على التوالي بعد 48 ساعة من الإجهاد, مما يشير إلى أن تلف غشاء البلازما كان موجودًا إلى حد معين في هذه النقطة الزمنية. . قمح/د.لينا/pone1

وفي دراسة أخرى تم فيها تعريض سبع شتلات من القمح لثلاث مستويات من الإجهاد الجفافي تبين فيها زيادة محتويات MDA بشكل كبير استجابة للإجهاد الجفافي, ومن ثم عادت وانخفضت مع إعادة الري (Zhang and Kirkham, 1994). نتائج هذا البحث **قمح / أجنبي/ MDA1 Drought** وفي بحثٍ آخر عرضت فيه أوراق وجذور شتلات القمح لظروف إجهاد الجفاف ازداد محتوى MDA بطريقة تعتمد على الوقت. (نتائج هذا البحث ص3 العمود 2)/2015. **قمح/أجنبي/14**

وكذلك كانت النتائج عند تطبيق الإجهاد الجفافي على كل من نباتات الألوفيرا, والستيفيا, وبراعم وجذور الكانولا , وشتلات الشوح, حيث زاد تركيز MDA **(Sadak *et al*., 2020)** نتائج هذا البحث **قمح / أجنبي/ MDA2 Drought (Hajihashem and Ehsanpour, 2013). (نتائج هذا البحث)** . **قمح / أجنبي/ Drought MDA3 (MIRZAI *et al*., 2013) . (نتائج هذا البحث)** . **قمح / أجنبي/ Drought MDA8** (Guo *et al*., 2010). **(نتائج هذا البحث)** . **قمح / أجنبي/ Drought MDA10**

**وقد أظهرت أوراق شتلات العوسج تحت ظروف الإجهاد الجفافي تراكمات من البرولين الحر و MDA أعلى منها في الجذور (Guo *et al*., 2018). (نتائج هذا البحث) قمح / أجنبي/ Drought MDA9**

**RWC**

يعتبر المحتوى المائي النسبي RWC مقياساً لحالة المياه في النبات, مما يعكس النشاط الاستقلابي في الأنسجة, ويستخدم كمؤشر ذو مغزى لتحمل الجفاف. يكون المحتوى المائي النسبي للأوراق أعلى في المراحل الأولى من نمو الأوراق وينخفض مع تراكم المادة الجافة ونضوج الأوراق. يرتبط المحتوى المائي النسبي بامتصاص الجذور للماء وفقدان الماء عن طريق النتح. لوحظ انخفاض RWC في مجموعة متنوعة من النباتات تحت ظروف الإجهاد الجفافي (Nayyar and Gupta, 2006). ص2029/ العمود 1 **قمح / أجنبي / 23 مؤشرات بيوكيميائية**

أكدت النتائج التي تحصل عليها (Sassi *et al.,*2012) أن محتوى الماء النسبي مؤشر جيد لتحمل الجفاف يمكن استعماله في برامج انتخاب القمح في الظروف الجافة. إذ وجد أن الإجهاد المائي الناتج عن النقص المائي يسبب هبوط المحتوى النسبي للماء عند كل الأنواع المختبرة, وأن الأنواع الوراثية التي تحتفظ بمحتوى ماء نسبي عالي خلال الإجهاد المائي تكون أكثر مقاومة وإنتاجية. ( قمح صلب جزائر RWC/ ص14)

تعتمد شدة تأثر RWC على شدة ومدة الإجهاد والأنواع النباتية (Yang and Miao, 2010). ص2029/ العمود 1 **قمح/ أجنبي/ 31 بيوكيميائية أجنبي,** فنلاحظ **أن** انخفاض RWC في نبات القمح تحت ظروف الإجهاد المائي لم يكن ملحوظ في الأصناف المتحملة, وسجلت أعلى قيمة ل RWC في الأصناف المتحملة , فيما سجلت القيمة الدنيا عند الأصناف الحساسة ص4 نتائج هذا البحث. **قمح/ أجنبي/ 31 بيوكيميائية أجنبي,**  (Bajji *et al.,*2001). (3)أو 10 خلال الإزهار موجودة في نورا قمح جفاف**.** يمكن أن يعزى التباين الوراثي في كفاءة الطرز الوراثية في المحافظة على محتوى الماء النسبي في خلايا الأوراق إلى القدرة على التعديل الحلولي أو التباين في درجة انغلاق المسامات استجابة للإجهاد الجفافي (Nye & Tinker, 1977). خطة البحث بعد السيمنار

أظهرت النتائج أن RWC في أوراق القمح انخفض بنسبة 1.92٪ بعد 24 ساعة من الجفاف وبنسبة 6.64٪ بعد 48 ساعة مقارنة مع الشاهد, أما في الجذور فكانت نسبة الانخفاض 9.47% بعد 24 ساعة و 13.66% بعد 48 ساعة, مما يشير إلى أن إجهاد الجفاف تسبب في جفاف خفيف إلى متوسط الإجهاد في نباتات القمح

وجد أيضًا أن RWC انخفض على المدى القصير في نباتات القمح المجهدة بالجفاف تحت ظروف المختبر. ومع ذلك ، تحت ضغط طويل الأمد ،انخفض مؤشر RWC في البداية ثم ظل ثابتًا نسبيًا بعد 28 يومًا. قمح/د.لينا/pone1

توصل **قمح بعد الخطة/تأثير الإجهاد المائي في بعض الصفات الفيزيولوجية لهجينين وحيدي الجنين من الشوندر السكري/ص83** في تجربة قام بها على نبات الشوندر إلى أن RWC كان في الأوراق الحديثة عند الشاهد بحدود (86-83-85%), وبعد 20 يوم من الجفاف كانت (83-79-81%), أما بعد 40 يوم من الجفاف فقد كانت (76- 71-73%).

**السكريات**

لاحظ (Bensari *et al*.,1990) أن تحمل الجفاف قد يكون راجعاً للاستعمال التدريجي للمدخرات النشوية, وأشار الكثير من الباحثين إلى الدور الوقائي الذي تلعبه السكريات الذائبة على مستوى الأنظمة الغشائية بصفة عامة والأغشية الميتوكوندرية بصفة خاصة (Bamoun.,1997) بالإضافة إلى ذلك فإن السكريات الذائبة تساهم في حماية الظواهر (التفاعلات) المؤدية إلى تركيب الأنزيمات الشيء الذي يسمح للنبات بتحمل أفضل لمؤثرات الجفاف (Duffus.,1989 in Bamoun.,1997). لاحظ (Ali dib *et al*.,1990) إن تغيرات محتوى القمح من السكريات الذائبة أضعف بكثير منها بالنسبة للبرولين وأن أكبر النسب تسجل إنطلاقاً من اليوم 12 من الإجهاد المائي. **. (قمح بعد الخطة/ كلوروفيل+برولين+سكريات قمح صلب- جفاف)**, أما النتائج التي توصل إليها (Adjab, 2002) و(Qayyum, 2011). خلال تقديره للسكريات عند خمسة أصناف من القمح الصلب تحت ظروف إجهاد الجفاف الناتج عن استخدام ال PEG فبينت أن هذه الأخيرة تبدي تراكماً ضعيفاً لها **(برولين + سكريات/ قمح بعد الخطة )** ص973/ العمود 2 قمح / أجنبي / بيوكيميائية أجنبي 32

يلعب محتوى السكريات القابلة للذوبان دوراً مهماً في استقلاب الكربوهيدرات وله علاقة وثيقة بالتمثيل الضوئي وبالإنتاج (Wilcox, 2001). ص973/ العمود 2 قمح / أجنبي / بيوكيميائية أجنبي 32

زاد محتوى **السكريات الذائبة** بنسبة 7.1٪～ 46.7٪ في الأوراق وبنسبة 121.2٪～ 189.9٪ في الجذور من 24 ساعة إلى 48 ساعة من الإجهاد الجفافي قمح/د.لينا/pone

**المؤشرات الجزيئية**

اتسم القرن الماضي باكتشافات مميزة على مستوى علم البيولوجيا, ولا سيما البيولوجيا الجزيئية. حيث كان هناك تقدم جوهري في استخدام الطرق الجزيئية في مجال تربية النبات, في الوقت الذي كان فيه التوصيف المورفولوجي هو الطريقة الوحيدة المستخدمة منذ اعتمادهم من قبل العالم النمساوي جورج ماندل. ويعد فهم ودراسة التركيب الوراثي للنبات اللبنة الأساسية لنجاح برامج تربية النبات التي ازداد اعتمادها على طرائق جديدة أسرع وأكثر فعالية لتطوير وإنتاج أصناف محسنة, ولزيادة الغلة (ICARDA,2003). **حيث زودت التطورات الأخيرة في علم الوراثة الجزيئية , مربي النباتات بأدوات قوية لتحديد واختيار المكونات المندلية الكامنة وراء كل من الصفات الزراعية البسيطة والمعقدة (Dekkers and Hospital, 2002).** (قمح بعد الخطة /مجلد جديد/ SSR Drougt maize Iran/ المقدمة العمود1)**, ففي محاولات للتغلب على مشكلة الجفاف, استخدم الباحثون المؤشرات الجزيئية Molecular markers لتحديد الأصول الوراثية ذات الصفات المتعلقة بتحمل الجفاف (Afiukwa et al., 2016).** .( قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ SSR Drought rice Sudan/ المقدمة)

**إن استخدام المؤشرات الجزيئية لاختيار الأصول الوراثية التي تمتلك المورثات والمناطق الوراثية التي تتحكم في الصفات المستهدفة يمكن أن تسرع من تقدم التربية لمقاومة الجفاف, وذلك لأن المؤشرات الجزيئية تنتقل من جيل إلى جيل دون أن تخضع للتأثيرات البيئية (Afiukwa et al., 2016).** .( قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ SSR Drought rice Sudan/ المناقشة العمود 1). وقد أثبتت الدراسات التي تستخدم المؤشرات الجزيئية عن نجاحها في تحديد مواقع الصفات الكمية (QTLs) Quantitative Trait Loci الكامنة وراء العديد من سمات تحمل الجفاف في كروموسومات الأرز. على سبيل المثال, أثبت Vasant(2012) أن 12 علامة SSR ترتبط ارتباطاً وثيقاً بصفات الجذر في ظل الجفاف بينما تظهر 14 علامة SSR ارتباطاً كبيراً بالمحصول ومكوناته في ظل الجفاف.( قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ SSR Drought rice Sudan/ المقدمة)

ولعل من أهم المؤشرات الجزيئية التقانات المعتمدة على تفاعل البوليميراز التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR). حيث يقوم تفاعل ال (PCR) بمضاعفة قطع محددة من الحمض الريبي النووي منقوص الاوكسجين ـDNA وذلك بوجود بادئات Primers عشوائية مثل تقنية التعددية الشكلية للـDNA المضخم عشوائياً Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), أو متخصصة مثل تقنيةالتسلسلات البسيطة المتكررةSimple Sequence Repeats (SSR) ، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من ال ـDNA التي تتضاعف أسياً, وذلك باستعمال دورات حرارية متعددة تصل لــــــــــ40 دورة (سيد، 2001؛ Karp et al., 1997)،**قمح بعد الخطة/مجلد جديد/ د.فاطمة الجنعير**

تعد مؤشرات التسلسلات البسيطة المتكررة ((SSR من المؤشرات الجزيئية المهمة جداً والواسعة الانتشار حالياً. تتكون هذه المؤشرات من مقاطع صغيرة متكررة، تسمى وحدات متكررة أو الميكروساتاليت Microsatellite، تتكون من توليفات مختلفة من أربع وحدات هي قواعد ال DNA الأدنيين(A)، والسيتوزين(C)، الجوانين(G)، والتيامين(T)، وهي تتواجد بكثرة في مجينات حقيقات النوى حيث قدرت من 10⁴ إلى 10⁵ موقع مبعثرة على طول الجينوم (Sefc et al., 2000). **قمح بعد الخطة/ SSR عنب**

يتم اختبار PCR الخاص بـ SSR باستعمال بادئات متخصصة، يتألف كل منها من شقين: الأول يدعى Forward، ويلتحم في المنطقة التي تقع قبل SSR، والثاني يدعى Reverse، ويلتحم في المنطقة التي تقع بعد SSR (Hamwieh وزملاؤه، 2005؛ Ordon وزملاؤه، 2005). د. فاطمة الجنعير

تعد ال SSR من التقنيات المهمة التي تتميز بموثوقيتها العالية ومثاليتها, وذلك لارتفاع معدل تطفرها حيث أنَّ كسب أو فقد تكرار واحد بين جيل وآخر، يفوق عشرة آلاف مرة احتمال حدوث طفرة تصيب قاعدة آزوتية واحدة في مورثة ما (Sweigart وزملاؤه، 1999). ووفرتها وتوزعها ضمن الجينوم وكذلك لتطلبها كميات قليلة من المادة الوراثية DNA (Wang *et al*.,2014), بالإضافة إلى إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة المشتركة Codominant في التوريث (Rafallski *et al.,* 1993), إمكانية أتمتتها حيث أنه يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النكليوتيدي لها, إلا أنَّه يُعاب عليها في أنَّها تحتاج إلى بادئات ذات تسلسل نكليوتيدي مُحدد، يُحدد مكان التكرار الترادفي للسلاسل البسيطة SSR (Yu, *et. al ,* 1994). د. فاطمة الجنعير

**في ظل الظروف البيئية التي تولد جهداً مائياً منخفضاً, تنتج النباتات مجموعة من البروتينات المحبة للماء كجزء من الاستجابة للإجهاد, لحماية الخلية (Allagulova *et al*., 2003; Arroyo *et al*., 2000; Ingram & Bartels, 1996**). **ص537/العمود 1 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/** **Plant-Dehydrins-2006. تم تمييز هذه البروتينات لأول مرة في القطن خلال المراحل المتأخرة من التطور الجيني, وسميت ببروتينات التخليق الجيني المتأخر LEA. بعد ذلك تم التعرف على البروتينات المماثلة للقطن LEA في بذور العديد من النباتات الراقية (Dure *et al*., 1989). ص537/العمود 1 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/** **Plant-Dehydrins-2006, السمة الأساسية لهذه البروتينات هي تركيبة الأحماض الأمينية المميزة والتي تؤدي إلى نسبة عالية من القطبية للماء (Wise & Tunnacliffe, 2004) ص2 العمود1 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد /LEA- Arabidopsis/**

**تم تحديد ثلاث مجموعات رئيسية من بروتينات LEA على أساس تشابه التسلسل والخصائص الهيكلية وهي: المجموعة الأولى, المجموعة الثانية, والمجموعة الثالثة. تنتمي الديهدرينات إلى المجموعة الثانية, وتوجد بشكل أساسي في الأنسجة النباتية الجافة, مثل البذور الناضجة, وفي الأنسجة النباتية المعرضة للجفاف ودرجة الحرارة المنخفضة, وظروف الملوحة المرتفعة (Nylander *et al*., 2001; Xu *et al*., 2008; kim & Nam, 2010).ص2/العمود1 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Dehydrin- Grapevine- 2012**

**توجد الديهدرينات في مجموعة واسعة من الكائنات الحية بما في ذلك النباتات العليا والطحالب والخميرة والبكتريا الزرقاء (Close, 1997; Mitwisha *et al*., 1998). ص537/العمود 1 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/** **Plant-Dehydrins-2006, وهي موجودة بنسب قليلة في معظم الأنسجة الخضرية أثناء ظروف النمو الطبيعي** (Rodriguez *et al.,*2005; Nylander *et al*., 2001; Rorat *et al*., 2004; Rorat *et al*., 2006; Garay *et al.,* 2000)**. قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/** **Plant-Dehydrins-2006, ويزداد تراكمها في الظروف البيئية القاسية مثل البرد والجفاف والملوحة والضغط الأسموزي (Close, 1997).قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/** **Plant-Dehydrins-2006 , ومن المثير للاهتمام أن الإفراط في التعبير عن جينات الديهدرين في السلالات المعدلة وراثياً يشجع مقاومة هذه السلالات لمختلف الإجهادات(Puhakainen *et al*., 2004; Peng *et al*., 2008; Shekhawat *et al*., 2011; Ochoa-Alfaro *et al*., 2011) . ص2/العمود1 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Dehydrin- Grapevine- 2012**

**مثل هذا التوزيع الواسع لبروتينات الديهدرين يشير إلى الدور الأساسي الذي تلعبه, في نمو النبات وفي تحمل الإجهاد. مما أثار اهتماماً كبيراً بها لاستخدامها في تحسين المحاصيل , علاوة على ذلك فقد تبين مؤخراً أن انخفاض مستويات الديهدرين في بذور نبات الأرابيدوبسيس المحورة وراثياً يؤدي إلى تقليل طول عمر البذور مما يؤكد أهميتها لبقاء البذور (Hundertmark *et al*., 2011). ص2/العمود1قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Dehydrin- Grapevine- 2012**

**لم يتم بعد تحديد آلية عمل الديهدرينات بدقة , ولكن من المقبول عموماً القول بأن وظيفتها حماية الخلايا من التلف الناجم عن الإجهاد الجفافي (Eriksson & Harryson, 2011) ص2/العمود2قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Dehydrin- Grapevine- 2012, فهي قادرة على الارتباط بالماء بقابلية عالية, مما يمنع فقد الماء من الخلايا حتى درجة الجفاف القاتل للنبات, ويساعد الخلايا على الاحتفاظ بحد أدنى من الماء لتبقى حية. (Ingram & Bartels, 1999) قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ كتاب فيزيولوجيا وبيولوجيا النبات الجزيئية هام**

لوحظ ارتباط إيجابي بين تعبير الديهدرين وتحمل الإجهاد الجفافي (Cseuz *et al*., 2002). قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought-wheat-important/ ص229 العمود 1.وقد توصل العديد من الباحثين إلى نتائج مماثلة, فقد زادت **القدرة على تحمل الإجهاد الجفافي والملحي عند إدخالها إلى الأرز والقمح. (Xu et al., 1996; Sivamani et al., 2000) . ص 744/العمود2 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Dehydrin-freezin**

**يحتوي كل من القمح والشعير على أربعة أنواع من الديهدرينات من أصل خمسة وهي (Kn, SKn, YnSKm, KnS) (Close,1997). بينما تفتقر إلى الديهدرينات من نوع YnKm**

**أكبر مجموعة من الديهدرينات في الشعير (10 من أصل 13 جين) وكذلك في القمح الشائع تنتمي إلى نوع YnSKm, والمستحثة بسبب الإجهادات القوية التي تسبب الجفاف (الجفاف, والملح, والصقيع) وكذلك بسبب حمض الأبسيسيك (ABA). / المقدمة/ العمود 2 قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Wheat- Dehydrin-3**

**تختلف مستويات التعبير عن الديهدرينات في ظل الإجهادات المختلفة فقد تم العثور على عشر مورثات ديهدرين للشعير في ظروف الإجهاد الجفافي, في حين تم العثور على ثلاث مورثات فقط تحت ظروف درجات الحرارة المنخفضة (Tommasini *et al*.,2008). ص2/العمود2قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Dehydrin- Grapevine- 2012, و لم يتم التعبير عن DHN1 العنب في ظل ظروف النمو الطبيعية, ولكن تم تحفيزها عن طريق الجفاف والبرد (Yazhou *et al*., 2012). نتائج هذا البحث قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Dehydrin- Grapevine- 2012**

**تم عزل 3 جينات ديهدرين محفزة بالملح من نبات القمح. كشف تحليل PCR أن جميع جينات الديهيدرين الثلاثة ((TaDHN1, TaDHN2, TaDHN3 يتم تحفيزها بشكل كبير بواسطة ABA و NaCl ، ولكن فقط TaDHN2 يتم تحفيزها في الشتلات بواسطة PEG والبرد (4 درجات مئوية). (Qin & Qin, 2016) الملخص قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought-Wheat-Dehydrins-2 / نتائج هذا البحث/ الملخص**

**قام (Lopez *et al*., 2001) بدراسة تراكم الديهيدرين في البادرت أثناء إجهاد الجفاف وارتباطه بتحمل الإجهاد أثناء ملء الحبوب في سبعة أصناف من القمح ، "Connie" ، "Gene" ، "TAM105" ، "Rod" ، "Hiller" و "Rhode" و "Stephens". فلاحظ تراكم 24 كيلو دالتون من الديهدرينات في البادرات في ظروف الإجهاد الجفافي, في حين لم تتراكم الديهدرينات في الشاهد. وبدأت الأصناف "Connie ، "Gene" ، "TAM105" في تراكم الديهيدرينات في اليوم الرابع من الإجهاد ، بينما بدأت الديهدرينات بالظهور في الأصناف الأخرى بعد اثني عشر يومًا من الإجهاد. هذا الاختلاف في التراكم في مرحلة البادرات ارتبط بتحمل الإجهاد في مرحلة ملء الحبوب، وتميَّز بانخفاض أقل في المحصول.نتائج هذا البحث قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Wheat- Dehydrin- Seedling- 4**

سبب الإجهاد الجفافي تراكم بروتينات الديهدرين خاصة ذات الوزن الجزيئي المنخفض في صنفين من القمح, وكان تراكمها في الصنف المقاوم (Omskaya 35) يفوق تراكمها في الصنف الحساس (Salavat Yulaev) بمرتين ونصف. **(Shakirova *et al*., 2016**)/ نتائج هذا البحث/ Drought- Wheat- Dehydrin- 5- 2016

**توصل (Patrizia *et al*., 2006) في بحث قام به لدراسة الاختلافات بين بادرات القمح والدوسر في استجابتها للإجهاد الجفافي على المستويين الفيزيولوجي والجزيئي إلى أن طريقة تعبير كل جين مختلفة مما يشير إلى أن كل جين في عائلة الديهدرينات قد يكون له وظيفة مميزة في استجابة النبات الجزيئية للجفاف. تم التوصل لذلك أيضاً في الشعير من قبل (Suprunova et al. 2004). /ص 2150 / العمود 2/ قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Wheat- Dehydrin- prolin- Rwc**

**3. أهمية البحث وأهدافه:**

**أهمية البحث ومبرراته:**

يحدث في النبات عدد كبير من التفاعلات للتغلب على الآثار الضارة الناجمة عن مجموعة واسعة من الإجهادات الحيوية وغير الحيوية بما في ذلك الضوء، الجفاف، الملوحة وارتفاع درجات الحرارة، ويعد الإجهاد الجفافي واحد من أهم الضغوط البيئية التي يتعرض لها النبات والتي تؤثر سلباً على إنتاجيته.

ولما كان القمح من أهم المحاصيل التي تزرع في الوطن العربي عامةً، وسوريا خاصةً، ونظراً لموجات الجفاف التي يتعرض لها العالم وتذبذب كمية الأمطار وعدم انتظامها، فإنه من الأهمية بمكان فهم الاستجابات البيوكيميائية والجزيئية للجفاف من قبل النبات وذلك لإدراك شامل لآلية مقاومة النبات لظروف ندرة المياه، فالأصل في عملية تكيف النبات مع البيئة هو الجينات وما يصاحبها من عناصر منظمة تجعل النبات أفضل نمواً، لذلك فإن هذه الدراسة التي تعتبر حديثة وغير مطروحة يمكن اعتبارها خطوة رئيسة أولية يستفاد منها لاحقاً في دراسات التربية والانتخاب ومن هنا تأتي أهمية البحث.

**أهداف البحث(** **Research Objecti**v**es):**

1. تحديد بعض المؤشرات البيوكيميائية المميزة للطرز المدروسة المرتبطة بتحمل الإجهاد الجفافي.
2. تحديد بعض المؤشرات الجزيئية المرتبطة بتحمل الإجهاد الجفافي للطرز المدروسة.
3. **مواد البحث وطرائقه (Materials and Methods):**
4. **المادة النباتية (Plant material):**

تتألف المادة النباتية من عشر طرز من القمح والتي تم الحصول عليها من مركز البحوث الزراعية وهذه الطرز هي:

**القمح القاسي (**حوراني ، شام 3 **،** شام 5 ،بحوث 9 ، اكساد 65**).**

**القمح الطري(**شام 10 **،** بحوث 10 **،** دوما 2 **،** دوما 6 **،** جولان 2**).**

**فيما يلي أهم مواصفات الطرز المدروسة:**

**طرز القمح القاسي:**

**حوراني:** إنتاجيته حوالي 1,71 طن/ه, السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط طولها 4-6 سم, لونها كريمي, الحبوب كروية لونها عنبري, طول النبات 68 سم, عدد الأيام للنضج التام 181 يوم.

**شام3:** إنتاجيته حوالي1,95 طن/ه, السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط, طولها 7-8 سم, لونها كريمي, الحبوب بيضوية لونها عنبري, طول النبات 61 سم, عدد الأيام للنضج التام 164 يوم.

**شام5:** إنتاجيته حولي 1,85 طن/ه, السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط, طولها 6-8 سم, لونها كريمي, الحبوب بيضوية لونها عنبري, طول النبات 56 سم, عدد الأيام للنضج التام 181 يوم.

**بحوث9:** إنتاجيته في الزراعة المروية 6,91 طن/ه,, السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط, طولها 7-8 سم, لونها كريمي غامق, الحبوب بيضوية نصف متطاولة لونها عنبري, طول النبات 89 سم, عدد الأيام للنضج التام 163 يوم.

**أكساد 65:** إنتاجيته تصل 3,17 طن/ه,, السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط, طولها4-6 سم, لونها كريمي غامق, الحبوب نصف متطاولة لونها عنبري, طول النبات 89 سم, عدد الأيام للنضج التام 165 يوم.

**طرز القمح الطري:**

**شام 10:** إنتاجيته في الزراعة المروية حوالي 8 طن/ه,, السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط لونها كريمي غامق, الحبوب بيضوية لونها عنبري, طول النبات 87 سم, عدد الأيام للنضج التام 159 يوم.

**بحوث 10:**

**دوما 2:** إنتاجيته حوالي 2,26 طن/ه,, السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط لونها كريمي, الحبوب بيضوية لونها عنبري, طول النبات 67 سم, عدد الأيام للنضج التام 159 يوم.

**دوما6:**

**جولان 2:** إنتاجيته حوالي 4,58 طن/ه,, السنبلة متوازية الشكل مقاومة للانفراط لونها كريمي, الحبوب كروية لونها عنبري, طول النبات 82 سم, عدد الأيام للنضج التام 164 يوم.

1. **مكان تنفيذ البحث (Site of Experiments):**

مخابر التقانات الحيوية في جامعة دمشق.

1. **طريقة الزراعة Planting method)):**

تم تعريض البادرة بمرحلة 3 أوراق حقيقية إلى الإجهاد الجفافي باستخدام تركيزين من البولي إيتيلين غليكول PEG6000 (-6, -12) بار. بالإضافة إلى عينات تحتوي على ماء مقطر فقط، تعد كشاهد, ثم تم إجراء التجارب على العينات المختبرة وذلك بعد (24 , 48 , 72 ) ساعة من التعريض للإجهاد. وأجري تحليل البيانات إحصائيا ً باستخدام برامج احصائية لتحديد معامل الاختلاف وتحديد معنوية القيم المدروسة، واستخدام اختبار L.S.D (Least Significant Difference) لمقارنة المتوسطات وتحديد معنوية الفروق فيما بينها.

صممت التجربة بالتصميم العشوائي الكامل وبثلاث مكررات والمخطط التالي يوضح توزيع المعاملات.



1. **القراءات المطلوبة:**

**التحاليل البيوكيميائية:**

**المحتوى المائي النسبي للسويقة والجذير:**

يبين المحتوى المائي الفعلي والمحتوى المائي عند التشبع (الإمتلاء التام للخلايا) ويقاس المحتوى المائي عند التشبع حسب طريقة (Barrs & Weatherley, 1962) قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Wheat- Dehydrin- prolin- Rwc 2006 بحفظ النبات في ماء مقطر لمده كافية (24 ساعة) في ظروف تمنع العمليات الأيضية (ظلام ودرجة حرارة منخفضة) حتى تتشبع الخلايا بالماء، ويحسب المحتوى المائي عند التشبع بتجفيف النبات وإيجاد وزنه الجاف ووزنه عند التشبع، ويحسب المحتوى المائي الفعلي كنسبة مئوية للمحتوى المائي عند التشبع حسب المعادلة التالية:

RWC% = {(FW-DW)/(TW-DW)} ×100

**تركيز بعض المواد الذوابة في السيتوبلاسم:**

يعتمد الجهد الأسموزي للخلية على محصلة الجزيئات أو الأيونات الموجودة حتى لو كانت لمركبات مختلفة، لذلك تلجأ النباتات أثناء الإجهاد إلى مراكمة أنواع مختلفة من المذابات المتوائمة في السيتوبلاسم، وتعمل هذه المذابات المتوائمة إما لخفض الجهد الأسموزي أي تجعله اكثر سالبية خاصة عند ارتفاع تراكيزها أو لحماية البروتينات والأغشية الخلوية، وقد تؤدي الوظيفتين معاً ومنها:

**تركيز الكربوهيدرات الذوابة (ميكروغرام.غˉ¹وزن رطب)::**

تم تقدير نسبة الكربوهيدرات الذائبة في الأوراق حسب طريقة (Herbet *et al*., 1971), حيث أخذ 1 غ من الأوراق الفتية، وأضيف لها 50 مل ماء مقطر مغلي وبعدها وضعت في حمام مائي بدرجة 80 درجة مئوية لمدة نصف ساعة بعد ذلك تم ترشيح العينة وأكمل الراشح الى 50 مل ماء مقطر، ثم أخذ 1مل من الراشح وأضيف له 1 مل من كاشف الفينول 5% ومزج جيداً ثم أضيف له 5 مل حمض الكبريت المركز H2So4، وأضيف له 10 مل ماء مقطر لغرض التخفيف ثم تم تقدير نسبة الكربوهيدرات الذوابة بقياس الشدة اللونيه بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 488 نانومتر

**تحضير المنحنى القياسي للكربوهيدرات الذائبة**

تم إذابة 100 ملغ من الغلوكوز في ليتر ماء مقطر ثم حضرت التراكيز ( 0, 10, 20, 40, 60, 80) ملغ / ل , ثم أخذ واحد مل من هذه التراكيز وأضيف له 1 مل من كاشف الفينول 5% ومزج جيداً وأضيف 5 مل من حمض الكبريت المركز ومزج جيداً بعدها حددت شدة اللون الناتج بقياس الكثافة الضوئية ب جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectophotometer) الضوئي عند طول موجي 488 نانو متر, ثم رسم المنحنى القياسي من العلاقة بين التركيز والكثافة الضوئية.

**-تركيز الحمض الأميني البرولين (ميكروغرام.غˉ¹وزنرطب):**

يُعدُّ التباين الوراثي في كمية البرولين المُتراكمة بين النباتات صفةٍ فيزيولوجيةٍ مهمةٍ في التعديل الحلولي، ويُقترح إمكانية اعتماده كمؤشر إنتخاب في برامج التربية، وقد أُوصي بذلك بالنسبة لمحاصيل الحبوب المزروعة في بيئة حوض المتوسط (Nanjo et al., 1999).

تم تحليل البرولين حسب طريقة (Bates, 1973). ، ﺤﻴﺙ تم أخذ وزن معين من العينة حوالي 0.5 غ طحنت مع 10 مل من محلول حمض السلفوسالسيلك 3% (إذابة 3غ من الحامض وإكمال الحجم حتى 100 مل ماء مقطر) ووضعت في جهاز الطرد المركزي 2000 دورة/ دقيقة مدة 10 دقائق , سحب 2مل من الرشاحة وضع عليها 2 مل من حمض الخل الثلجي و 2مل من نينهدرين Ninhydrin ( الذي حضر بمزج 1.25 غ من الننهيدرين مع 30 مل من حمض الخل الثلجي و 20 مل من حمض الفوسفوريك 6 مول) يترك محلول الننهيدرين على المحرك المغناطيسي دون حرارة حتى تمام الذوبان، ثم وضعت الأنابيب لمدة ساعة في حمام مائي درجة حرارته 100 درجة مئوية، (يلاحظ في هذه المرحلة بدء ظهور اللون الأحمر بدرجات متفاوتة حسب تركيز البرولين, بعدها وضعت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي لوقف التفاعل, ثم أضيف للمزيج 4مل من التولوين، ومزج بشكل جيد لمدة عشرين ثانية، وترك عدة دقائق في درجة حرارة الغرفة لتنفصل طبقة التولوين وما تحمله من البرولين فوق المخلوط، أخذ من هذه الطبقة 3 مل ثم تم قياس البرولين بواسطة جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectophotometer) بطول موجه 520 نانومتر وخلية زجاجية فيها سمك المسار الضوئي 1 سم, وتمت مقارنته مع منحنى قياسي للبرولين النقي.

**المنحنى القياسي للبرولين:**

رسم المنحنى القياسي للبرولين حسب طريقة (Bates et al., 1973), حضر المحلول الأساسي بإذابة 0.011513غ من البرولين النقي وإكمال الحجم حتى 100 مل فكان تركيزه 115.13 ميكروغرام/مل, ثم حضرت من هذا المحلول الأساسي التراكيز التالية (4.6, 9.2, 11.5, 23) ميكروغرام/مل, بعدها أخذ 2مل من كل تركيز وأضيف لها 2 مل حمض خل ثلجي و2 مل ننهايدرين, ثم وضعت الأنابيب لمدة ساعة في حمام مائي درجة حرارته 100 درجة مئوية, بعدها وضعت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي لوقف التفاعل, ثم أضيف للمزيج 4مل من التولوين، ومزج بشكل جيد لمدة عشرين ثانية، وترك في درجة حرارة الغرفة لتنفصل طبقة التولوين وما تحمله من البرولين فوق المخلوط، أخذ من هذه الطبقة 3 مل ثم تم قياس البرولين بواسطة جهاز قياس الطيف الضوئي بطول موجه 520 نانومتر, رسم المنحنى القياسي للبرولين وفي ضوئه تمت قراءة العينات مع المنحنى القياسي وقدر تركيز البرولين في الأوراق.

**-محتوى السويقة والجذير من المالون داي ألدهيد (MDA) (ميكرومول.غˉ¹):**

يشير مستوى MDA في النباتات إلى درجة إصابة بلازما نظام الغشاء (Hui *et al.,* 2015) . قمح/د.لينا/pone1, وتستخدم عادة درجة أكسدة اللبيدات لتقدير مدى تضرر الأغشية الخلوية بإجهاد الأكسدة لذلك سيتم تقدير تركيز(MDA) وهو الناتج النهائي لأكسدة لبيدات الأغشية الخلوية وذلك بحسب طريقة (Carmak & Horst, 1991) حيث تم طحن 1 غ من العينة الطرية من الأوراق وأضيف لها 3 مل من محلول (TCA) Trichloroacetic acid 0.1% (w/v), ووضعت في أنابيب معقمة, فصل بعدها باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 20000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة, أخذ 0.5 مل من الرائق وأضيف له 3 مل من (TBA) Thiobarbituric acid 0.5% والمحضر من TCA 20% , ثم تم تسخين الخليط عند 95مْ في حمام مائي مع الرج لمدة 50 دقيقة, وبعدها بردت الأنابيب في حمام ثلجي مباشرة لوقف التفاعل, ومن ثم فصلت بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق, أخذ الرائق وتم تقدير MDA في جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectophotometer) عند الأطوال الموجية (450, 532, 600) نانومتر, قدر محتوى MDA بالميكرومول/غ وزن طري حسب المعادلة الموصوفة من قبل (Gao,2000).

MDA= {6.452\* (D532-D600)- 0.559 \* D450}\* Vt/V1\*FW

Vt: الحجم الكلي للاستخلاص (مل).

V1: حجم السائل المستخلص للاختبار (مل).

FW: وزن الأوراق الطري (1غ).

**تركيز الكلوروفيل في أوراق البادرات (ملغ.غˉ¹وزن طري):**

للكلوروفيل أنواع A,B,C,D,F وهو من الصبغات المرتبطة باقتناص الطاقة الضوئية اللازمة للبناء الضوئي استخدمت طريقة (Arnon, 1949) لاستخلاص الكلوروفيل حيث تم طحن 1غ من الأوراق النباتية الغضة في هاون خزفي مع 20 مل من الأسيتون 80% لمدة 5 دقائق حتى تم استخلاص الصبغات من الأوراق الغضة, ثم وضع المستخلص في جهاز الطرد المركزي لمدة خمس دقائق على سرعة 1000 دورة/دقيقة. بعد ذلك أخذ 3مل من الرائق وقدر الكلوروفيل (أ, ب) باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectophotometer) عند الأطوال الموجية 663, 645 نانومتر باستخدام المعادلات التالية:

Total chlorophyll (mg/g) = 20.2 (A645 )+ 8.02 (A663)

Chlorophyll a (mg/g) = 12.7 (A663) -2.69(A 645)

Chlorophyll b (mg/g) =22.9(A 645 ) -4.68 (A663)

A: الكثافة الضوئية لمستخلص الكلوروفيل عند طول الموجة الموضحة.

**المؤشرات الجزيئية**

**- استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA Extraction :**

يعزل الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين (DNA) من الأوراق الفتية بطريقة ـCTAB المعدلة وفقاً لما أشار إليه (Murray and Thompson, 1980) وفق الخطوات التالية:

1. يوزن 0.8 غ من الأوراق الفتية لكل عينة، تطحن ضمن هاون بوجود الأزوت السائل **(**-196°م**)**Liquid N2 إلى بودرة ناعمة حيث توضع المادة النباتية ضمن أنابيب أبندورف Eppendorf Tube معقمة سعة(2 ml ).
2. يضاف لكل أنبوب(عينة نباتية) 800µl من محلول الاستخلاص الحاوي على المكونات التالية:

(120mM Tris-HCl (PH 8.0)، 80mM، EDTA (PH 8.0)، 4%β-mercaptoethanol ( v/v)، 3% (w/v) CTAP ، 2% PVP (w/v) ، 1.4 M NaCl ).

بعد المجانسة توضع على حمام مائي درجة حرارته(65 °م) لمدة ساعة واحدة مع مراعاة المجانسة مرة ثانية بمنتصف فترة التحضين، ثم توضع العينات في البراد على درجة حرارة 4ºم لمدة 5 دقائق.

1. يضاف لكل عينة من العينات النباتية حجم مماثل لحجم محلول الاستخلاص من مادة الكلوروفورم أيزو أميل الكحولChloroform / Isoamyl alchohol (24:1)، تحرك الأنابيب بلطف مدة 10 دقائق، ثم تترك على الرجاج لمدة عشرين دقيقة.
2. توضع الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) (Univeral 32R, Germany) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4ºم، حيث يتم في هذه المرحلة فصل المزيج إلى طورين، ينقل بعدها الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب Eppendorf جديدة سعة (1.5 ml).
3. تكرر مرة ثانية خطوة المعاملة الكلوروفورم أيزو أميل الكحولChloroform / Isoamyl alchohol (24:1) والمجانسة والتثفيل كما في الخطوات السابقة.
4. يضاف لكل أنبوب 600 ميكروليتر من Isopropanol المبرد على حرارة (- 20 ْم) إلى الحجم الكلي مع التحريك بلطف وتترك العينات بعدها على درجة حرارة (- 20 ْم) لليوم التالي وذلك من أجل ترسيب الحمض النووي DNA.
5. في اليوم التالي توضع الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4ºم.
6. يتم التخلص من الرشاحة بإضافة (200 µl) من محلول الإيتانول 70% لراسب الحمض النووي ـDNA ، تثفل الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق، ويجفف راسب الحمض النووي DNA عند حرارة (37ºم) مدة (10) دقائق.
7. يذاب الحمض النووي DNA في(50 µl) من محلول TE المكون من كلا من (10mM Tris, 1mM EDTA, pH(8.0)).
8. يتم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة (2µl) من أنزيم RNase (10mg/ml) والتحضين على درجة حرارة(37ºم) مدة نصف ساعة، ثم يضاف حجم مماثل من الكلوروفورم أيزو أميل الكحولChloroform / Isoamyl alchohol (24:1).
9. بعد التثفيل ونقل الطور العلوي لأنبوب جديد، يضاف لكل عينة ضعف كمية المزيج من الإيتانول ethanol النقي لإعادة ترسيب الحمض النووي DNA، ويترك المزيج على درجة حرارة 4ºم لمدة ساعة.
10. يرسب المزيج بواسطة جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق، ثم يغسل الراسب من جديد بواسطة الإيتانول 70% ويجفف في الهواء للتخلص من آثار الإيتانول، ثم يذاب الحمض النووي DNA في 100 ميكروليتر من محلول TE المعقم.
11. بعد ذلك تحفظ العينات بدرجة حرارة 4ºم لمدة 24 ساعة، ثم تخزن على درجة حرارة (- 20 ْم) لحين الاستخدام.

**- تقدير كمية الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين الـDNA ونوعيته بواسطة جهاز المطياف الضوئي UV:**

تقدر كمية الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA في العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي(spectrophotometer- UV)الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و 280 نانومتر.

تقدر نوعية الحمض النووي DNA بالاعتماد على طريقة الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة أغاروز(agarose gel) تركيز2% مضافاً لها مادة Ethidium bromide، التي ترتبط مع الـحمض النووي DNA مشكلاً معقداً يتوهج إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية، حيث أن جزيئات الحمض النووي DNA تهاجر على هلامة الآغاروز كحزم أو بقع، وتكون عينات الحمض النووي DNA ذات جودة جيدة عند عدم وجود تقطعات فيها، ثم تمدد عينات الحمض النووي DNA للحصول على تركيز 50 نانوغرام/ ميكروليتر لتستخدم في التفاعل التسلسلي البوليميري.

**- تطبيق تقنية SSR :**

سيستخدم في الدراسة أزواج من البادئات المتخصصة سيتم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية، وسيجرى تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ (Williams *et al, 1990*)**.**

عملية التضخيمAmplification ستتم في جهاز التدوير الحراري من شركة (Technetc – 512, UK) ، وفق البرنامج الحراري التالي:

- دورة واحدة بدرجة حرارة (94) درجة مئوية ولمدة خمس دقائق ليتم انفصال سلسلتي الـحمض النووي DNA تبعت بـ (40) دورة كل دورة تضمنت:

- التحطم حراري لسلسلة DNA المزدوجة (Denaturation) على حرارة (94º) درجة مئوية ولمدة نصف دقيقة.

- الالتحام (Annealing) على حرارة بين ( - 4850º) درجة مئوية ولمدة دقيقة واحدة.

- استطالة (Extension) على حرارة (72º) درجة مئوية ولمدة دقيقة واحدة.

واستطالة نهائية ولدورة واحدة عند حرارة (72º) درجة مئوية ولمدة عشرة دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة º4م لتفصل الحزم بعدها بالترحيل على هلامة الآغاروز

**الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:**

سيتم الترحيل على هلامة الميتافورآجاروز4% في المحلول المنظم 1X TBEوالمكون من:

{(10X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g Boric acid + 9.2 EDTA, pH 8.0)}والمضاف إليها 5µl من صبغة الايثيديومبرومايد (10 mg/ml)، حيث تحمل عينات الحمض النووي DNA على هلامة الميتافور آجاروز بإضافة 5 ميكرولتر من سائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) و المكون من:

(15% Ficoll 400 + 1.03 % Bromophenol blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)

سيتم حقن مؤشر من الحمض النووي (DNA) 1Kpb من شركة(Fermentas, Germany) ، وذلك لتحديد الحجم و الوزن الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط وذلك لفصل حزم الـحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم، لتصور الهلامة بعد ذلك بجهاز تصوير هلامة الآجاروزImage Analyzer

1. **التحليل الإحصائي:**

بالنسبة للدراسة البيوكيميائية:

سيتم تحليل البيانات إحصائيا ً باستخدام برامج احصائية لتحديد معامل الاختلاف وتحديد معنوية القيم المدروسة، واستخدام اختبار L.S.D(Least Significant Difference) لمقارنة المتوسطات وتحديد معنوية الفروق فيما بينها.

بالنسبة للدراسة الجزيئية:

ستجمع نتائج عملية الرحلان الكهربائي الناتجة عن تطبيق تقنية SSR وتنظم في جداول لكل بادئة على حده اعتماداً على وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA في العينات المدروسة، حيث يدل الرقم 1 على وجود حزمة الـحمض النووي الواضحة فقط والرقم 0 يدل على غياب الحزمة بحسب (Nei, 1987 (، وسيجرى التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج V1.31 POPGENE(Yeh, 1999)، وتتم دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافق(PAV) Percent Agreement Values ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها وفقاً ل (Nei,1972), ويجرى التحليل العنقودي اعتماداً على نتائج المسافة الوراثية بين الطرز المدروسة وفقاً لمعادلة (Nei, 1987), وترسم شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المتزنة UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging) بحسب (Sneath and Sokal, 1973 (.

1. **النتائج والمناقشة RESULTS and DISCUSSION)):**

يلاحظ من الجدول (1) ارتفاع قيمة البرولين مع زيادة شدة الإجهاد الجفافي في جميع الأصناف المدروسة, وكانت أعلى قيمة له (22.537 ميكرو غرام/ غ), سجلت عند الصنف أكساد 65 بعد 48 ساعة من التعرض للإجهاد الجفافي بتركيز -12 بار. حيث كان متوسط قيمة هذا المؤشر للأصناف جميعها في ظروف الشاهد (6.552 ميكرو غرام/ غ) وارتفع مع زيادة تركيز PEG إلى (13.358 ميكرو غرام/ غ) عند التركيز -6 بار و إلى (14.229 ميكرو غرام/ غ) عند التركيز -12 بار, كما أن قيمة البرولين زادت مع زيادة مدة الإجهاد الجفافي, فقد بلغ متوسط قيمته عند جميع الأصناف (9.806, 10.132, 14.200 ميكرو غرام/ غ) وذلك بعد (24, 48, 72 ساعة) على التوالي. وكان متوسط البرولين الأعلى معنوياً عند الصنف شام3 ( 14.485 ميكرو غرام/ غ) في حين كان الأدنى معنوياً عند الصنف جولان2 (8.830 ميكرو غرام/ غ).

وهذا يتفق مع ما توصل إليه (Monneveux et Nemmar.,1986). أن تراكم البرولين عند القمح غير مرتبط بمرحلة معينة من النمو إنما هو ناتج عن الإجهاد المائي, وكذلك النتائج التي توصلت إليها (الحماد, 2006) حيث أن المحتوى البروليني قد زاد بزيادة الفترة الزمنية التي عرض فيها نبات القمح للإجهاد الجفافي وذلك لتقليل الضرر الذي يسببه الإجهاد للخلايا. عن طريق تعطيش النباتات لمدة (3,6,9,12) يوم حيث سجل أعلى معدل(7,92 ميكروغرام/مل) وذلك بعد 12 يوم من تعطيش النباتات مقارنة بالشاهد الذي سجل (1,35 ميكروغرام/مل), أما أدنى معدل فقد بلغ (1.67 ميكروغرام/مل) وذلك بعد 3 أيام من التعطيش.

**ثانياً: تأثير الإجهاد الجفافي على محتوى الكلوروفيل:**

يلاحظ من الجدول (2) ارتفاع محتوى الكلوروفيل مع زيادة شدة الإجهاد الجفافي, وبلغ أعلى قيمة له (66.073 ملغ/غ) عند الصنف شام 10 بعد 72 ساعة من الإجهاد الجفافي بتركيز -12 بار, حيث كان متوسط قيمة الكلوروفيل للأصناف جميعها في ظروف الشاهد (33.498 ملغ/غ), وارتفع مع زيادة تركيز PEG إلى (50.558 ملغ/غ) عند التركيز -6 بار, و إلى (55.254 ملغ/غ) عند التركيز -12 بار, كما أن قيمة الكلوروفيل زادت مع زيادة مدة الإجهاد الجفافي, فقد بلغ متوسط قيمته عند جميع الأصناف (42.851, 48.303, 47.682 ملغ/غ) وذلك بعد (24, 48, 72 ساعة) على التوالي. وكان متوسط الكلوروفيل الأعلى معنوياً عند الصنف شام10 ( 49.211 ملغ/غ) في حين كان الأدنى معنوياً عند الصنف جولان2 (43.236 ملغ/غ).

وهكذا كانت النتائج التي توصل إليها (Bhupinder and Usha, 2003)حيث أشارت إلى ارتفاع محتوى الكلوروفيل في نبات القمح تحت ظروف الإجهاد الجفافي, وكذلك أيضاً توافقت نتائج هذا البحث مع ما توصل إليه (Ait Kaki,1993; Siakhène,1984). حيث اختلفت عدة أصناف من القمح في استجابتها, فمنها من خفضت تركيزها من الكلوروفيل, في حين وفي نفس الظروف تبنت أصناف أخرى طريقة معاكسة في المقاومة, كما أن تركيز الكلوروفيل تغير حسب مدة وشدة الإجهاد وهذا ما أشار إليه (Kpyoarissis et al., 1995; Zhang and Kirkham, 1996).

1. **الاستنتاجات Conclusions)):**
2. **التوصيات (Recommendations):**

**تطوير نباتات محاصيل أكثر مقاومة للجفاف هدف مستقبلي ضروري للتخفيف من التهديدات المستقبلية لتوافر الغذاء في اتجاه التوسع الديموغرافي للسكان البشريون (Plucknett et al. 1987).** ومع ذلك، هذا يتطلب استكشافًا شاملاً للعديد من الإمكانات الموارد الوراثية وفهم متعمق لآلية التكيف والاستجابات للإجهاد المائي ذلك تسمح بالبقاء في بيئة غير ودية./ المناقشة **قمح بعد الخطة/ مجلد جديد/ Drought- Wheat- Dehydrin- prolin- Rwc 2006**

1. **المراجع:**
2. **المراجع العربية:**
3. **المراجع الأجنبية:**

المركز الدولي لبحوث القمح والذرة International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)

**Abstract:**