



## التعبير المورثي للهوردئين B أثناء تشكل نسيج السويداء في حبوب الشعير

### B-Hordein Gene Expression During Development of Endosperm in Barley Grains

م. منار مخول<sup>(1)</sup> م. بثينة السلامة<sup>(1)</sup> د. سلام لاوند<sup>(3-2)</sup> أ.د. حسن عزام<sup>(2)</sup>

M. Makhoul B. Alsalamah S. Lawand H. Azzam

(1) الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق. makhoulmen@gmail.com

(2) قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(3) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/أكساد.

#### الملخص

نُفذ البحث في مخبر البيولوجيا الجزيئية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية (دمشق/سورية) خلال موسم عام 2014/2013، بهدف تحديد الاختلافات في مستويات التعبير المورثي للهوردئين B خلال مراحل تشكل نسيج السويداء في حبوب الشعير، إضافة إلى تحديد مسار تراكمه، كونه يشكل نحو 70 إلى 80 % من بروتينات التخزين في الحبوب. تم قياس مستويات mRNA الناسخ لمورثة الهوردئين B باستخدام تفاعل بوليمراز السلسلي الكمي بالزمن الحقيقي (RT-qPCR) في خمس مراحل من تشكل الحبة لأربعة طرز شعير؛ اثنان يمثلان الشعير المزروع (*Hordeum vulgare* subsp.) هما فراتو وعربي أبيض، وطرانان من الشعير البري (*H. vulgare* subsp. *spontaneum*) من الرقة والحسكة. تم الكشف عن نسخ مورثة الهوردئين B عند الطرز المزروعة في اليوم السادس بعد الإزهار. شهد الطرانان فراتو وعربي أبيض تراكم نسخ هذه المورثة من اليوم العاشر إلى اليوم 25 بعد الإزهار بزيادة قدرت بـ 87.25 و 84.8 مرة على التوالي، بينما ازداد عدد نسخ الـ mRNA تدريجياً عند طرازي الشعير البري من الرقة والحسكة حتى اليوم 20 بعد الإزهار بمعدل 119.6 و 93.25 مرة على التوالي، ليتناقص بعدها إلى 74.65 و 73.55 مرة على التوالي في اليوم 25. كان مستوى التعبير المورثي لمورثة الهوردئين B في الطرز البرية أعلى منه في الطرز المزروعة بشكل معنوي من اليوم 14 حتى اليوم 20 بعد الإزهار. أشارت نتائج هذه الدراسة إلى أن تعبير مورثة الهوردئين B يتعلق بالزمن والطران الوراثي، مما يسمح باستغلال محفز مورثات عائلة بروتينات الهوردئين في الهندسة الوراثية وزيادة كفاءة برامج تربية الشعير، من خلال تحسين نوعية حبوب الشعير اعتماداً على الاستخدام النهائي للمنتج، إما حبوباً للعلف أو غذاءً للإنسان أو في التصنيع الغذائي.

**الكلمات المفتاحية:** مورثة هوردئين B، تفاعل بوليمراز السلسلي الكمي في الزمن الحقيقي، شعير مزروع وبري.

## Abstract

The research was carried out in the molecular biology laboratory at the National Commission for Biotechnology (NCBT- Damascus / Syria), during the season of 2013 / 2014, to determine the difference in gene expression levels of B-Hordein during endosperm development in barley grains, also to illustrate its accumulative curve, because B-hordien comprises about 7080%- of all storage proteins. B-Hordein mRNA levels were measured using reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), during five phases of grain development in four genotypes representing two barley cultivars (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*), Furat 9 and Arabi Abiad, and two wild spontaneous barleys (*H. vulgare* subsp. *spontaneum*), from Raqqa and Hassakeh. The transcripts of B-Hordein genes in cultivated genotypes were detected at 6 days after anthesis (DAA). In Furat 9 and Arabi Abiad genotypes, B-Hordein transcript accumulation increased by 87.25, 84.8 folds respectively from 10 to 25 DAA, while wild genotypes of Raqqa and Hassakeh increased gradually until 20 DAA with increase 119.6 and 93.25 folds respectively and decreased subsequently to 74.65 and 73.55 folds at 25 DAA. B-Hordein mRNA level in wild genotypes was significantly higher than in cultivated ones at 14 and 20 days after anthesis.

This study showed that the expression of B-Hordein gene is influenced by time and genotype. These data are useful for utilizing the promoters of the B-hordein gene family for genetic engineering and increasing the efficiency of barley breeding program, through improving the grain quality, depending on product end-use, either for feed grain, human food or food industries.

**Key words:** B-Hordein gene, RT-qPCR, Cultivated and wild barley.

## المقدمة

يُعد الشعير (*Hordeum vulgare* L.) من المحاصيل الحبية الاستراتيجية التي تدخل ضمن متطلبات الأمن الغذائي للبشر وعلفًا للحيوانات على حد سواء، ويأتي عالمياً في المرتبة الرابعة بعد القمح والرز والذرة الصفراء، من حيث المساحة والإنتاج حسب قاعدة البيانات الإحصائية لمنظمة الغذاء العالمية (FAO, 2010). يملك الشعير قيمة غذائية متكاملة للدواجن والمجترات في مختلف مناطق العالم، ويدخل ضمن الصناعات الغذائية، إذ يمكن أن يستعمل مع القمح في صناعة الخبز، كما يدخل في صناعة البيرة والنشاء (Mishra وShivakumar, 2000).

تمت مراجعة آلية التحكم المورثي في كمية بروتين حبوب الشعير من قبل Ullrich (2002)، ووجد أن هذه الصفة عديدة المورثات (Polygenic)، إذ أظهرت خرائط مواقع الصفات الكمية (QTLs) توزعها على كامل صبغيات الشعير، في حين يشفر الهوردئين الذي يُعد من بروتينات التخزين الرئيسية في سويداء حبوب الشعير من قبل ثلاثة مواقع عديدة المورثات تتموضع على الصبغي رقم 5 (*Hor1* (1H)، *Hor2*، *Hor3*، ويقسم الهوردئين إلى ثلاث زمر اعتماداً على الوزن الجزيئي (Field وزملاؤه، 1982؛ Shewry وTathma، 1990)، تضم الزمرة الأولى B-hordeins بروتينات غنية بعنصر الكبريت، وتشكل 70 إلى 80% من بروتينات التخزين، وتتراوح أوزانها الجزيئية بين 35 و46 كيلودالتون، والثانية C-hordeins تحوي بروتينات فقيرة بعنصر الكبريت، وتشكل 10 إلى 12% من بروتينات التخزين، وتتراوح أوزانها الجزيئية بين 55 إلى 75 كيلودالتون، أما الزمرة الأخيرة D-hordeins فتتضم بروتينات ذات وزن جزيئي يفوق 100 كيلودالتون (Shewry وزملاؤه، 1995). ومن خصائص بروتينات الهوردئين أنها ذوابة في الكحول وتشكل نحو 35 إلى 55% من محتوى البروتين الكلي في حبوب الشعير (Jaradat، 1991). يتراكم الهوردئين في المراحل الأخيرة من نضج حبوب الشعير، فلاحظ Kumar و Matta (2011) أن الألبومينات (Albumins) تمثل الجزء الأعظم من بروتينات الحبوب في اليوم الرابع بعد الإزهار، ثم يتفوق عليها الغلوتين (Glutenins) في مراحل تطور الحبوب اللاحقة، في حين يتقدم البرولامين (Prolamin) بعد أن كان في مستويات متدنية عند بداية الإزهار ليصبح أعلى بروتين بعد الغلوتين في اليوم 25، ويستمر البرولامين والغلوتين بالازدياد حتى اليوم 45 بعد الإزهار. أما الغلوبولين (Globulin) فتتزايد نسبته بشكل تدريجي لتعود وتنخفض في اليوم 30 بعد الإزهار.

نجحت برامج التربية التقليدية في السنوات الماضية في زيادة الغلة الحبية من خلال زيادة عدد الحبوب في وحدة المساحة، في حين بُدلت محاولات حديثة لتحسين جودة ووزن الحبة لكن أغلبها باء بالفشل. ويُعبر بشكل عام عن وزن الحبوب الجافة بمعدل تراكم المادة الجافة في الحبوب، وطول فترة نمو الحبة (Brocklehurst، 1977)، مما أعطى حافزاً قوياً لدراسة التعبير المورثي (Expression gene) والخصائص البيوكيميائية لبروتينات الهوردئين، والاستفادة من التنوع الوراثي الموجود في الأنواع البرية والأصناف المحلية للشعير (شومان وزملاؤها، 2001، 2007).

هدف البحث: نتيجةً لنقص المعلومات حول بنية ووظيفة عائلة مورثات الهوردئين، ونظراً لأهمية بروتينات B-Hordein كونها تشكل نحو 70 إلى 80 % من بروتينات التخزين في الحبوب، فقد هدف البحث إلى دراسة التغيرات في مستوى نسخ mRNA لمورثة B-Hordein خلال مراحل تشكل الحبوب عند أربعة طرز من الشعير المزروع والبري باستخدام تقانة تفاعل بوليمراز السلسلي الكمي في الزمن الحقيقي RT-qPCR.

## مواد البحث وطرائقه

### المادة النباتية :

أجريت الدراسة في مخبر البيولوجيا الجزيئية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية (دمشق، سورية) خلال موسم عام 2013/2014، باستخدام أربعة طرز وراثية من الشعير المزروع والبري (الجدول 1). تم الحصول على الحبوب من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية السورية (GCSAR)، والمركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA) في سورية. عُقمت الحبوب بوساطة هيبوكلوريت الصوديوم 20 % لمدة دقيقة واحدة، ثم غُسلت بالماء المقطر عدة مرات، وجُففت على ورقة ترشيح. زُرعت الحبوب في خليط من التورب والبتمس والرمل (1:2:1) ضمن أصص بلاستيكية، واتبعت معيار Zadoks (Zadoks وزملاؤه، 1974) كطريقة موحدة لقياس مراحل نمو المحاصيل، ووفقاً لذلك تم حصاد السنابل في الصباح الباكر بعد 6 و 10 و 14 و 20 و 25 يوماً بعد نهاية مرحلة الإزهار، علماً أن الجمع تم بأخذ الحبوب النامية في وسط السنبلة ووضعها ضمن أنبوب يحتوي على الآزوت السائل مباشرة، ليصار إلى نقلها وحفظها بدرجة حرارة -80 م° إلى حين إجراء عملية استخلاص RNA. تم تجميع عينات الحبوب من ثلاثة نباتات تمثل كل طراز خلال مراحل النمو المختلفة.

الجدول 1. طرز الشعير الوراثية ومصدر الجمع.

المصدر	الموقع	الطرز/ رقم المدخل	تحت نوع	النوع
GCSAR	سورية	فراتو	subsp. vulgare	<i>Hordeum vulgare</i>
GCSAR	سورية	عربي أبيض محسن	subsp. vulgare	<i>Hordeum vulgare</i>
ICARDA	الحسكة - سورية	IG38639	subsp. spontaneum	<i>Hordeum vulgare</i>
ICARDA	الرقعة - سورية	IG39843	subsp. spontaneum	<i>Hordeum vulgare</i>

### استخلاص RNA الكلي من الحبوب النامية :

تم استخلاص RNA الكلي من الحبوب المطحونة في الآزوت السائل باستخدام الطقم الكيميائي (Qiagen) RNeasy mini kit. واستبعاد آثار DNA ضمن عينة RNA المستخلص باستخدام الطقم (Qiagen) RNase-Free DNase Set. والتحقق من نجاح عملية استبعاد DNA بترحيل عينات RNA على هلامة أغاروز الفورمالدهيد (Formaldehyde Agarose Gel) وفق طريقة Sambrook وزملائه (1989).

### اصطناع السلسلة المتممة cDNA :

تم تركيب السلسلة المتممة (cDNA) لجزيئات الـ mRNA بدءاً من 450 نانوغراماً من RNA الكلي المستخلص باستخدام المرئسة Oligo (dT)<sub>18</sub>، وأنزيم النسخ العكسي RevertAid M-MuLV RT وفق تعليمات الشركة المصنعة (Thermo Scientific).

### المورثة المرجعية (Reference gene validation) :

تم التحقق من ثبات التعبير المورثي للمورثة المرجعية ألفا توبولين ( $\alpha$ -tubulin reference gene) خلال جميع مراحل النمو ولكل الطرز الوراثية باستخدام برنامج BestKeeper (Pfaffl وزملاؤه، 2004)، بعد الأخذ بعين الاعتبار نتائج كل من Suprunova وزملائه (2004) و Han وزملائه (2010) التي أظهرت ثباتية التعبير المورثي لهذه المورثة في الشعير، وبالتالي أمكن اعتمادها مورثة مرجعية لضبط (Normalization) بيانات التعبير المورثي لمورثات الهوردئين في كل من الطرز المزروعة والبرية المدروسة.

### التفاعل السلسلي لبوليميراز في الزمن الحقيقي RT-qPCR :

بما أن حساسية تقانة Real Time PCR تتفاوت تبعاً لتسلسل الهدف (Target sequence)، وزوج المرئسات المستخدم، وضماناً لحساسية

عالية للتقانة؛ تم تصميم زوج مرئسات نوعي لمورثة B-Hordein اعتماداً على تسلسل مرئسات Han وزملائه (2010)، بعد تقييم مدى تطابقها مع التسلسلات النوكليوتيدية لطرز الشعير المدروسة المودعة من قبلنا في البنك الوراثي (GeneBank) تحت الأرقام التالية: KP872306 و KP872303 و KP866149.

تم استخدام زوج من المرئسات النوعية لتحديد عدد نسخ مورثات B الهوردئين QBF/QBR، واستخدم زوج المرئسات QTF/QTR لمورثة Alpha tubulin (الجدول 2). أنجز التفاعل بحجم نهائي قدره 50 µl يتكون من 25 µl SYBR Green PCR Master Mix و 10 µl من cDNA الممدد بنسبة 1:40 و 0.5 µM من كل من المرئسة الأمامية والعكسية. تم تفاعل qRT-PCR باستخدام جهاز Stratagene MX3005P وفق البرنامج الحراري التالي: 95 م° مدة 10 دقائق، ثم 40 دورة تتألف من ثلاث مراحل؛ 95 م° مدة 30 ثانية، و 58 م° مدة 30 ثانية، و 72 م° مدة 52 ثانية. تمت إضافة مرحلة الانفصال الحراري (Heat dissociation) إلى البرنامج الحراري في نهاية التفاعل بغية التأكد من نوعية التضاعف (65 م° إلى 95 م° منحى درجة الانصهار Melting curve).

#### B. الجدول 2. المرئسات المستخدمة في تفاعل qRT-PCR لمورثة الهوردئين

المرئس	التسلسل (5' - 3')	طول القطعة
QBF	GGTATTCCTCCAGCAGCAGTG	179bp
QBR	CAGAAAAGATAGAGTAGACGATTGC	
QTF	CTCCATGATGGCCAAGTGTG	243bp
QTR	TGGAGATCATGCACACAGCC	

#### التحليل الوراثي:

استخدمت طريقة Pfaffl (2004) لحساب قيمة التغير النسبي الكمي (R) وفق المعادلة التالية:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{T, \text{target}}(\text{calibrator-test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{T, \text{ref}}(\text{calibrator-test})}}$$

حيث:

**E<sub>target</sub>**: فعالية تضخيم المورثة الهدف، **E<sub>ref</sub>**: فعالية تضخيم المورثة المرجعية.

**ΔC<sub>T,target</sub>**: الفرق في الدورة الحدية (Ct) بين العينة (Test) والشاهد (Calibrator) في تفاعل تضخيم المورثة الهدف. (الدورة الحدية لتفاعل تضخيم المورثة الهدف في العينة المعيارية بالشاهد).

**ΔC<sub>T,ref</sub>**: الفرق في الدورة الحدية (Ct) بين العينة والشاهد في تفاعل تضخيم المورثة المرجعية. (الدورة الحدية لتفاعل تضخيم المورثة المرجعية في العينة المعيارية بالشاهد).

وتعد طريقة Pfaffl إحدى أهم الطرائق المتعارف عليها لتحديد الاختلافات في التركيز بين العينات وتقوم على الضبط بمورثة مرجعية واحدة، على أن يتم تضخيم كل من المورثة المستهدفة والمورثة المرجعية بفعالية عالية من أجل مقارنتها بدقة، لذلك تم تحديد كفاءة تفاعل PCR لكل من مورثة B-hordein والمورثة المرجعية α-tubulin وفق المعادلة التالية:

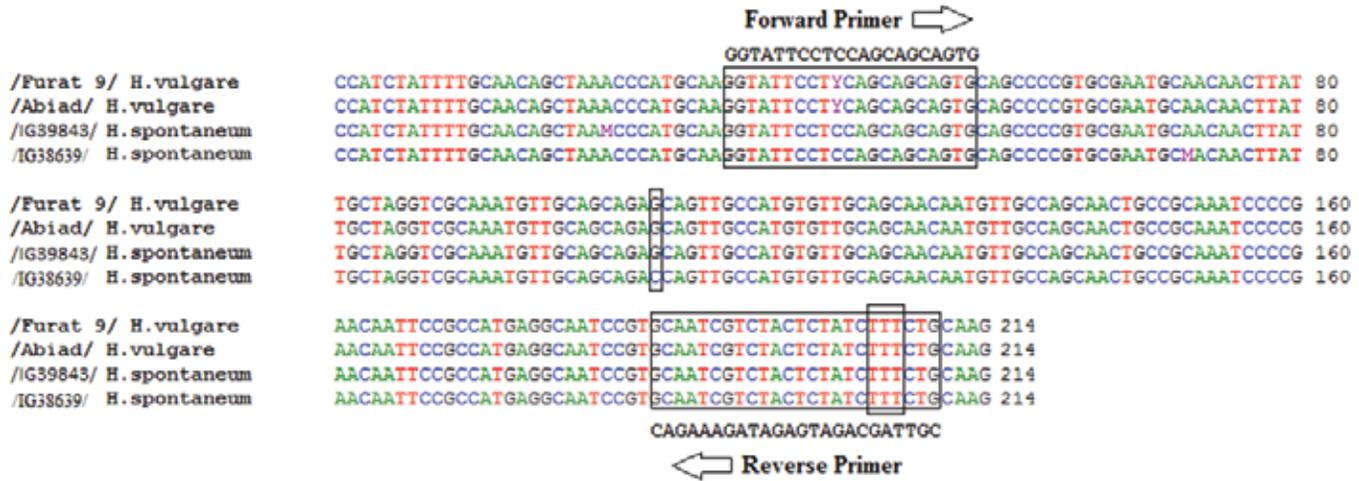
$$\% \text{Efficiency} = (E - 1) \times 100\%$$

حيث: **E = 10<sup>-1/slope</sup>**

حدد التغير في مستويات التعبير المورثي مقارنةً بالمورثة المرجعية α-tubulin، وتمت معايرة التعبير المورثي عند الأيام 6 و 14 و 20 و 25 بعد عملية الإزهار مقارنةً باليوم 10. كما تمت معايرة جميع الطرز مقارنةً بالطراز IG39843 من الرقة خلال المراحل الأربع لتشكل الحبوب. تم التحقق من البيانات الخام (Raw data) وتقييم مدى جودتها ووثوقيتها باستخدام برنامج MxPro QPCR. كما تم إجراء اختبار فيشر لأقل فرق معنوي Fisher's least significant difference (LSD) test عند مستوى 0.05، باستخدام برنامج SPSS (الإصدار 17).

## النتائج والمناقشة

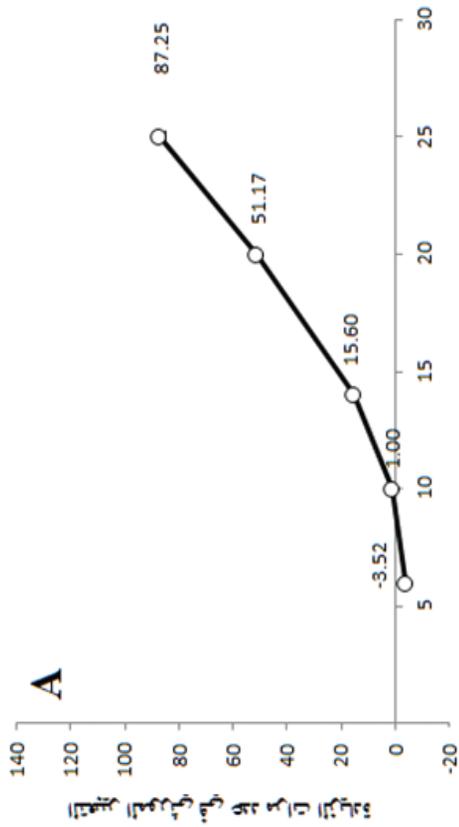
أخذ زوج المرئسات المنشور في بحث Han وزملائه (2010) موقعه على التسلسلات الهدف في جميع الطرز بشكل مصفوفات تبدو فيها مواقع تلدنه (Annealing) والمنطقة الوراثية المستهدفة، إلا أن المرئسة العكسية لم تتطابق مع تسلسلات موقعها ضمن المصفوفة جميعاً إلا في نيكلويتدين فقط من الطرف 5، وعليه تم التعديل ليوافق التطابق التام، بينما تطابقت المرئسة الأمامية كاملة مع السلسلة الهدف في جميع الطرز (الشكل 1). بلغت كفاءة تفاعل بوليمراز السلسلي 92.07% لمورثة B-hordein و 95.58% للمورثة المرجعية، ما يشير إلى جودة التفاعل وثباتية التحليل. علاوة على ذلك، أثبت منحني الانفصال لمنتجات التفاعل نوعية التفاعل وكشف عن قمة وحيدة دائماً، كما أعطت منتجات RT-qPCR عند ترحيلها على هلامة الأغاروز 2% حزمة مفردة بالطول المتوقع 179 bp.



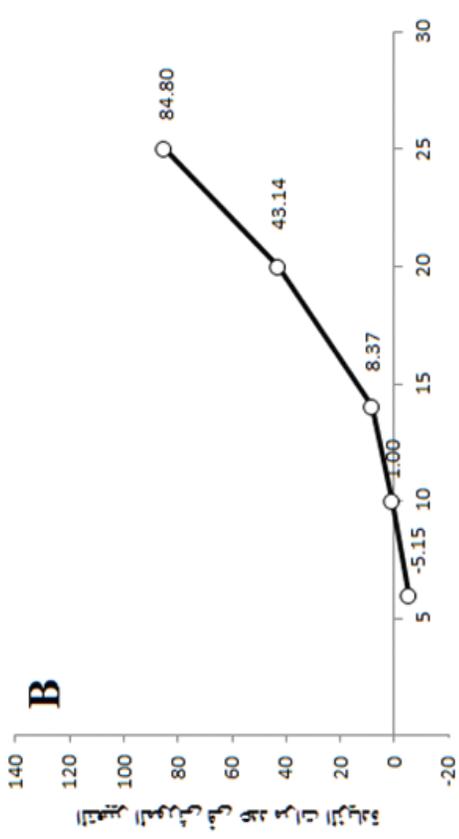
الشكل 1. اصطفاف التسلسلات النوكليوتيدية لطرز الشعير المدروسة.

دُرس التغير في النسبة الكمية لتعبير المورثات المسؤولة عن B-hordein في خمس مراحل لتشكيل حبوب الشعير، بهدف تحديد معدل التراكم والمسار الزمني الذي تتبعه. بيّنت النتائج أنه تم تسجيل أثر mRNA لمورثة B-Hordein في اليوم السادس بعد الإزهار في طرز الشعير المزروع *H. vulgare* (فرات وعربي أبيض محسن)، وهذا يخالف نتائج Rahman وزملائه (1982) الذين وجدوا أن أول ظهور لـ RNA الهوردئين متعدد الرايوزومات (Polyribosomal) في الشعير المزروع كان في اليوم 14 بعد مرحلة الإزهار، في حين اتفقت النتائج المتحصل عليها مع كل من Han وزملائه (2010) و Kaczmarczyk وزملائه (2012) بملاحظة وجود نسخ mRNA لمورثات B-hordein في المراحل المبكرة بعد الإزهار؛ من اليوم 4 إلى اليوم 10 بعد الإزهار. على خلاف ذلك، لم يلاحظ في هذه الدراسة أي أثر لـ mRNA في طرازي الشعير البري *H. spontaneum* (من الرقة والحسكة) في اليوم 6 بعد الإزهار. أظهر الطرازان فرات وعربي أبيض مسار تراكم متزايد لنسخ التعبير المورثي mRNA من اليوم 6 إلى اليوم 25 بعد الإزهار، بمعدل زيادة بلغ 87.25 و 84.8 مرة على التوالي مقارنةً باليوم 10، وهذا يتوافق مع العديد من الدراسات التي وجدت أن ذروة التعبير المورثي للهوردئين B في الشعير المزروع كان بين يومي 12 و 25 بعد الإزهار (Rahman وزملائه، 1984؛ Hansen وزملائه، 2008؛ Han وزملائه، 2010)، بينما اختلف هذا المسار في طرازي الشعير البري IG39843 من الرقة و IG38639 من الحسكة ليبلغ قمته في اليوم 20 بعد الإزهار بمعدل زيادة بلغ 119.6 و 93.25 مرة على التوالي، ليتناقص بعدها إلى 74.65 و 73.55 مرة على التوالي في اليوم 25 (الشكل 2). ويدعم ذلك ما سجله كل من Briarty وزملائه (1979) و Rahman وزملائه (1984) حول الزيادة الكبيرة في حجم الشبكة البلاسمية الداخلية الخشنة (Endoplasmic reticulum) في اليوم 14 و 18 بعد الإزهار في القمح والشعير على التوالي. اقترحت تلك الملاحظات أن الاختلاف في مستوى التعبير المورثي بين الطرز المدروسة يمكن أن يعكس اختلافات جوهريّة في أليلات مورثة الهوردئين B، وبتعبير آخر، فإن التباين على مستوى التركيب النوكليوتيدي لمورثات الهوردئين B في طرز الشعير يمكن أن يؤثر في كمية mRNA.

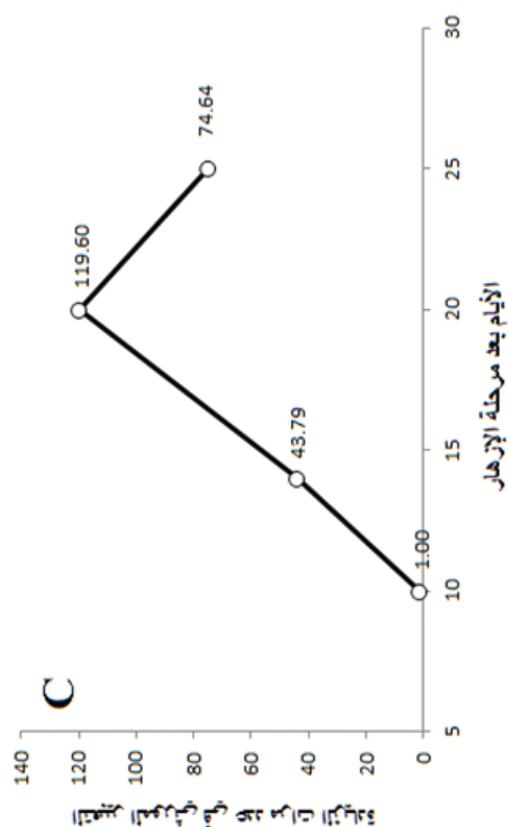
كما يُعتقد أن تعبير المجموعات المختلفة من مورثات عائلة الهوردئين B يتفاوت مع نمو الحبة من جهة، وأيضاً بسبب طفرات في عناصر المنطقة المنظمة للمورثة (Cis-regulatory elements) من جهة أخرى، وهذا ما نوه إليه كل من Kreis وزملائه (1983) و Hansen وزملائه (2008) و Han وزملائه (2010).



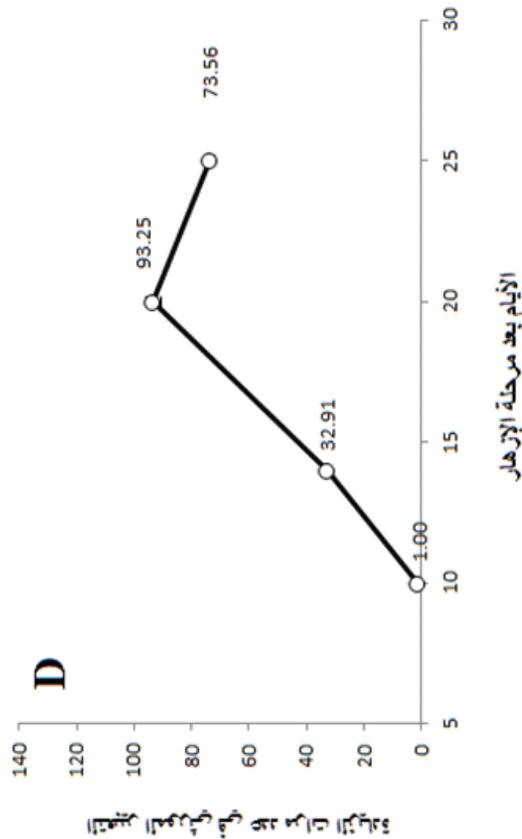
الأيام بعد مرحلة الإزهار



الأيام بعد مرحلة الإزهار



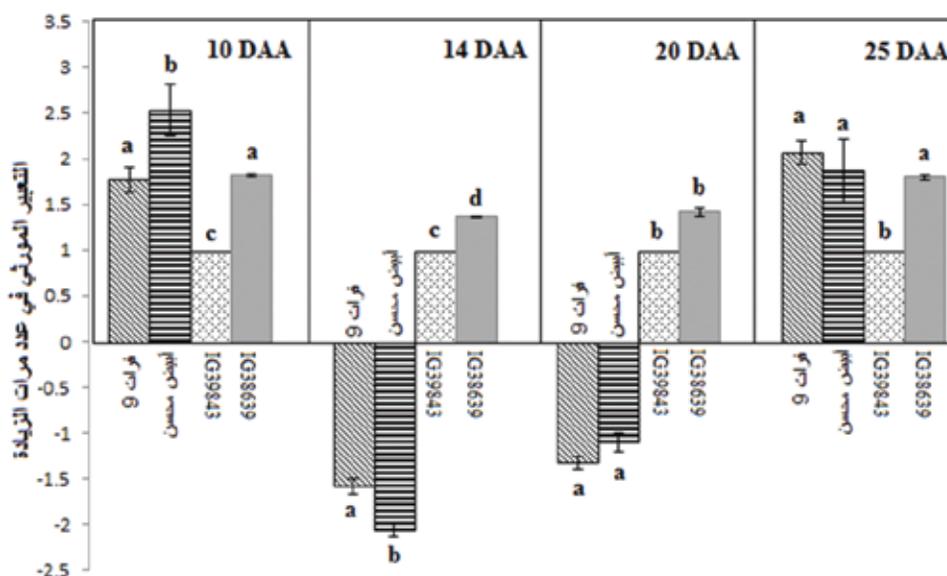
الأيام بعد مرحلة الإزهار



الأيام بعد مرحلة الإزهار

الشكل 2. تغير التعبير المورثي للمورثة B-Hordein في طرز الشعير البري والمزروع، A: الطراز المزروع /فرات و/، B: الطراز المزروع /عربي أبيض محسن/، C: الطراز البري من الرقة/IG39843/، D: الطراز البري من الحسنة/IG38639/.

أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ( $p < 0.05$ ) بين كل الطرز في اليوم 14 بعد الإزهار، يضاف إلى ذلك الفرق المعنوي بين مجموعتي الطرز المزروعة والبرية في اليوم 20. وُجد أيضاً أن الطراز عربي أبيض محسن امتلك أعلى مستويات نسخ لمورثة B-Hordein بين جميع الطرز عند اليوم 10، كما تفوق طراز الحسكة في وفرة نسخ mRNA في اليوم 14 بعد الإزهار مقارنةً بباقي الطرز، وهنا لا بد من ذكر نتائج Ceccarelli وزملائه (2000) حول ارتفاع نسبة البروتين في بعض الأصول البرية من الشعير البري *H. spontaneum*. ويعزى هذا التفاوت في كمية نسخ mRNA لمورثات الهوردئين B بين الطرز المدروسة أثناء تشكل سويداء الحبوب إلى عدة عوامل تم ذكرها سابقاً. إضافةً إلى ذلك، يتميز الشعير البري *H. spontaneum* بصفة الباكورية (Ceccarelli وزملائه، 2000) كآلية للهروب من الظروف البيئية غير المناسبة والحفاظ على النوع، وبناءً على ذلك يلاحظ أن الشعير البري سجل أعلى معدل تراكم نسخ mRNA في اليوم 14 و 20 مقارنةً بالطرز المزروعة (الشكل 3)، بينما تناقص عدد هذه النسخ تدريجياً بعد اليوم 20 بعد الإزهار، على خلاف الطرز المزروعة التي استمرت فيها نسخ mRNA بالزيادة (الشكل 2)، ويُعتقد أن ذلك يعود لقصر فترة نضج الحبوب عند الطرز البرية.



الشكل 3. التغيرات في عدد مرات التعبير المورثي عند الأيام 10 و 14 و 20 و 25 بعد الإزهار (DAA)

في سويداء حبوب الشعير المتشكلة للسنين فراتو وعربي أبيض ولطرازي الشعير البري من الرقة والحسكة.

ملاحظة: تمت معايرة جميع الطرز مقارنةً بالطراز البري/1G39843 من الرقة. الأعمدة التي تمتلك أحرفاً مختلفة ضمن كل موعد تكون متباينة بشكل معنوي ( $P < 0.05$ )، وتمثل أعمدة الخطأ (Error Bars) الخطأ المعياري.

## الاستنتاجات

- كشفت تقنية RT-qPCR أثر الـ mRNA لمورثات B-hordein خلال المراحل الأولى من الإزهار في اليوم السادس عند طرز الشعير المزروعة. كما لوحظ وجود تباينات في مستويات التعبير المورثي لمورثات B-Hordein المشفرة من قبل الموقع *Hor2* خلال فترة نمو الحبوب. وبالتالي يمكن أن تعزى هذه الاختلافات إلى التباين الأليلي في الطرز المختلفة، إضافةً إلى الاختلاف في بنية مورثة B-hordein.

- بينت هذه الدراسة أن تعبير مورثة الهوردئين B يتعلق بالزمن والطراز الوراثي، إذ يكون مستوى تعبير مورثة الهوردئين B في الطرز البرية أعلى منه في الطرز المزروعة بشكل معنوي عند اليوم 14 واليوم 20 بعد الإزهار. كما أن نسق التعبير المورثي (Gene expression profile) مهم جداً في تحديد دور محفزات (Promoters) عائلة مورثة B-Hordein، وبالتالي يمكن تحسين كفاءة برامج تربية الشعير باستخدام الهندسة الوراثية.

## المقترحات

- ضرورة إجراء دراسات إضافية لتحديد ما إذا كانت الاختلافات في المناطق غير المترجمة (Untranslated regions)، قبل موقع بدء عملية النسخ خاصةً (-50bp) لمورثة B-Hordein من شأنها أن تؤثر في مستويات التعبير المورثي، ولاسيما في طرز الشعير المزروعة والبرية.

- استخدام كل من التقانات (Acid-PAGE, SDS-PAGE, IEF) للحصول على فكرة شاملة عن تعابير بروتينات الهوردئين ضمن طرز الشعير خلال مراحل تطور سويداء الحبة.

## كلمة شكر

نتوجه بالشكر إلى الأستاذ الدكتور محمد فواز العظمة (قسم الوقاية في كلية الزراعة بجامعة دمشق) على ما قدمه من ملاحظات مهمة.

## المراجع

- شومان، وفاء؛ غزال، حسن؛ اشتر، سها وباوم، مايكل. 2001. التنوع الوراثي في الشعير السوري باستخدام مؤشرات الـ RAPD. مجلة جامعة الملك سعود. (99): 33-5.
- شومان، وفاء؛ معلا، محمد؛ الخولاني، محمد العزي وباوم، مايكل. 2007. التنوع الوراثي للشعير في اليمن باستخدام مؤشرات المقاطع البسيطة المتكررة (SSR). مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية، سلسلة العلوم البيولوجية. 29 (1): 181 - 194.
- Briarty, L. G., C. E. Hughes and A. D. Evers. 1979. The Developing Endosperm of Wheat - A Stereological Analysis. Ann.Bot., 44: 641 - 658.
- Brocklehurst, P.A. 1977. Factors controlling grain weight in wheat. Nature, 266: 348 - 349.
- Ceccarelli, S., S. Grando, R. Tutwiler, J. Baha, A.M. Martini, H. Salahieh, A. Goodchild, and M. Michael. 2000. A Methodological Study on Participatory Barley Breeding. Selection Phase. Euphytica, 111: 91 - 104.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2010. FAOSTAT. <http://www.faostat.fao.org/>
- Field J.M, P.R. Shewry, and B.J. Mifflin.1982. The purification and characterization of homologous high molecular weight storage proteins from grain of wheat, rye and barley. Theor Appl Genet, 62:329 - 336.
- Han, Z., F. Wu, G. Deng, G. Qian, M. Yu and Y. Jia. 2010. Structural and expressional analysis of the B-hordein genes in Tibetan hull-less barley. Genetica, 138: 227 - 239.
- Hansen, M., S. Bowra, M. Lange, P.B Holm, and E. Vincze. 2008. Transcriptome study of storage protein genes of field-grown barley in response to inorganic nitrogen fertilisers. proceedings of 10th international barley symposium. Alexandria, Egypt: 702 - 711.
- Jaradat, A.A.1991. Grain protein variability among populations of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) from Jordan. Theor Appl Genet, 83:164 - 168.
- Kaczmarczyk, A., S. Bowra, Z. Elek and E. Vincze. 2012. Quantitative RT-PCR based platform for rapid quantification of the transcripts of highly homologous multigene families and their members during grain development. BMC Plant Biol., 12:184 - 184.
- Kreis, M., S. Rahman, B.G. Forde, J. Pywell, P.R. Shewry and B.J. Mifflin. 1983. Sub-families of hordein mRNA encoded at the hor 2 locus of barley. Mol Gen Genet , 191:194 - 200.
- Kumar, Y., and N. K. Matta. 2011. Changing protein profiles in developing and germinating barley seeds. Annal. Biol. Res., 2: 318 - 329.
- Mishra, B. N. and B. G. Shivakumar. 2000. Barley. In: Techniques and Managements of Field Crop Production. Agrobios. India
- Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In A-Z of Quantitative PCR, Bustin S.A., ed (La Jolla, CA: International University Line): 87 - 112.
- Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet, and TP. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology letters, 26:509 - 515.
- Rahman, S., P. R. Shewry and B. J. Mifflin. 1982. Differential protein accumulation during grain development. J. exp. Bot., 33: 717 - 728.
- Rahman, S., M. Kreis, B. G. Forde, P. R. Shewry and B. J. Mifflin. 1984. Hordein gene expression during development of the barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. Biochem J., 223(2): 315 - 322.
- Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring: Harbor Laboratory Press.
- Shewry, P., J. Napier and A. Tatham.1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. Plant Cell., 7:945 - 956.
- Shewry, P.R., and A.S. Tatham.1990. The prolamine storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochem J., 267: 1- 12.
- Suprunova, T., T. Fahima, G. Chen, I. Shams, A. Korol and E. Nevo.2004. Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. Plant Cell Environ, 27:1297 - 1308.
- Ullrich, S. E. 2002. Genetics and breeding of barley feed quality attributes. In Barley science recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality, (Eds GA, Slafer, JI Molina-Cano R Savin, JL Araus, I Romagosa). Food Products Press: New York :115 - 142.
- Zadoks, J.C., T. T. Chang and B.F. Konzak. 1974. A decimal code for growth stages of cereals. Weed Res., 14: 415 - 421.

N° Ref- 639