جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

الكشف عن مورثات بروتينات الصدمة الحرارية HSP_{70} و HSP_{90} وعوامل النسخ الحراري HSF وتعبيرها الجيني في كالس نبات الحمص *Cicer arietinum* L.

أنوار فخري ذنون حمودي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ

الدكتورة جميلة هزاع رشيد

١٤٤٣هـ ٢٠٢٢م

الملخص

تمكنت الدراسة الحالية من الكشف عن التعبير لمورثات بروتينات الصدمة الحرارية *HSP*70 و *HSP*90 وعوامل النسخ الحراري *HSF*s في مزارع أنسجة كالس الحمص *Cicer arietinum* L. والمعرضة إلى بعض الصدمات اللا إحيائية وعززت الصدمات الفيزيائية في كالس الأجنة وكالس السيقان تحت الفلقية للحمص المستحدث على الوسط موارشيج وسكوك (MS) الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ نفثالين حامض الخليك (NAA) و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ بنزايل ادنين (BA) في دعم بناء بروتينات الصدمة الحرارية HSPs التي تساهم في إنتاج نباتات حمص متحملة أو مقاومة للصدمات الحرارية والبرودة والموجات فوق السمعية وانعكاساتها في المحتوى البروتيني والأوزان الرطبة للكالس والفاعلية النوعية لبيروكسيد الهيدروجين والدهون المؤكسدة MDA (Malondialdehyde).

اتصف كالس الأجنة بسهولة وسرعة استحداثه وبنيته المتماسكة عند استحداثه من أجنة كاملة وبنيته الهشة عند استحداثه من أنصافها على وسط الاستحداث ذاته مقارنة مع كالس السيقان تحت الفلقية. كشفت الدراسة عن الوسط الأفضل لإنتاج نباتات جديدة من تمايز الكالس إلى أفرع خضرية بنسبة 100% في وسط MS بوجود 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ ثايدايزورون (*TDZ*) من كالس الأجنة التي سجلت 76.6% من كالس السيقان تحت الفلقية. وتميزت الأفرع الخضرية بكثافة نمواتها وقصر سيقانها، في حين شجع وسط MS المدعم بإضافة 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin و5.0 ملغم لتر$^{-1}$ IAA تمايز الأفرع الخضرية التي إمتازت باستطالتها وسمك أقطارها. ولوحظ أن خفض السكروز في الوسط المذكور شجع تجذير الأفرع الخضرية المتمايزة بعد 35 يوم من نقلها. وقد حفزت التراكيز العالية 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ TDZ نشوء تراكيب شبيهة بالأجنة الجسمية والتي أخفقت في تطورها إلى نباتات كاملة على وسط MS0 الصلب.

ونجحت عملية تجذير أفرع الحمص المتمايزة من الكالس في وسط MS الصلب بنصف قوته التركيبية والمجهز بإضافة 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ NAA و0.4 ملغم لتر$^{-1}$ IBA مع خفض تركيز السكروز إلى 10 غم لتر$^{-1}$ ترتب عنها سهولة أقلمتها.

أفرزت نتائج الدراسة الحالية الدور الداعم للصدمة الحرارية قصيرة المدى 5 و 10 دقائق وطويلة المدى 15 و20 دقيقة في زيادة كل من الأوزان الرطبة للكالس ومحتواه البروتيني، وقد شجعت الصدمة 45 م°/ 15 دقيقة و40 م°/ 20 دقيقة كالس الأجنة وكالس السيقان تحت الفلقية حصول زيادة كبيرة في محتواه من البروتينات وزيادة فاعلية بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 والدهون المؤكسدة MDA استجابة لفعل الصدمة الحرارية، الذي انعكس في زيادة نمو الكالس وزيادة أوزانه الرطبة وأدى تجاوز هذه الصدمة انخفاضاً واضحاً في مستويات هذه المؤشرات في

الكالس. وأوضحت النتائج أن تعريض كالس الأجنة والسيقان تحت الفلقية لصدمة البرودة (صفر مئوي) لمدة 20 دقيقة دعمَّ زيادة كتلة الكالس ومحتواه البروتيني مع زيادة مستويات H_2O_2 و MDA. وأبرزت نتائج تعريض كالس الأجنة والسيقان تحت الفلقية للموجات الصوتية فوق السمعية 47.6KHz ولفترات تعريض 5، 10، 15، 20، 30، 40، 60 دقيقة زيادة كتلة الكالس الكالس ومحتواه البروتيني ومستويات بيروكسيد الهيدروجين والدهون المؤكسدة ووجد أن مدى التعريض 40 دقيقة كانت الأنسب في دعم هذه المؤشرات. ووجدت النتائج انخفاض مستويات الكلوروفيل في أنواع الكالس المعرض للصدمات الفيزيائية وعدم تأثره في الكالس غير المعامل.

وأفضت الدراسة الحالية إلى إيجاد أفضل وسط لإنشاء مزارع المعلقات الخلوية من الكالس الهش، مع استبدال السكروز وإضافة المانيتول كمصدر كاربوني، في وسط MS السائل المدعم بإضافة 1.0 ملغم لتر$^{-1}$ NAA و2.0 ملغم لتر$^{-1}$ BA. وأظهرت الخلايا قابليتها في الانقسام وزيادة أعدادها لتسجل كثافتها في اليوم الرابع من عمر المزرعة 45 × 10^4 خلية/ مل للمزارع المشتقة من كالس الأجنة و34 × 10^4 خلية/ مل للمزارع المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية. وأدت زراعتها بطمرها في قطرات الأكار المتعددة في المزارع الصلبة– السائلة إلى إنتاج أعداد كبيرة من المستعمرات الخلوية تطور معظمها إلى بادئات الكالس callus primordia والتي أُنتجت منها مزارع الكالس.

وأوضحت نتائج تعريض مزارع المعلقات الخلوية إلى صدمات حرارية منتخبة، فقد شجع تعريض مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الأجنة للصدمة الحرارية 40°م/ 20 دقيقة زيادة تكوينها للمستعمرات الخلوية وتطورها إلى بادئات الكالس منتجة 184 بادئة/ قطرة كما شجعت الصدمة 35°م/ 15 دقيقة إنتاج أعداد كبيرة من البادئات بلغت 124 بادئة/ قطرة في المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية، التي تطورت لاحقاً إلى مزارع الكالس. وبصورة مماثلة حفَّز تعريض مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الأجنة والسيقان تحت الفلقية للصدمة الصوتية فوق السمعية ولمدد تراوحت 1، 2، 3، 4، 5 دقائق الانقسامات الخلوية وتكوين بادئات الكالس عند مدة التعريض 2 و3 دقائق وبنسب 92 – 100%، وتواصل الدور الداعم لهذه الصدمة في تعزيز أنشطة الكالس المشتق من المعلقات الخلوية. في حين أخفقت مزارع المعلقات الخلوية المعرضة لصدمة البرودة (صفر مئوي) في استمرار انقسام خلاياها ترتب عنها عدم تكوين المستعمرات وتطورها إلى بادئات الكالس.

وعزَّزت النتائج المتحققة قدرة تحمل أنسجة كالس الحمص للإجهادات اللاإحيائية، متضمنة درجات الحرارة والبرودة والموجات فوق السمعية، في حث مورثات عوامل الصدمة الحرارية Heat Shock Factors (*HSF*) لإنتاج مجموعتي بروتينات الصدمة الحرارية

Heat Shock Proteins 90 (HSP90S و Heat Shock Proteins 70 (HSP70) بسرعة لإزالة البروتينات المشوهة وتجنب موت الخلايا المبرمج وبالتالي دعمّ التحمل للفعل المفاجئ لهذه الصدمات. نجحت الدراسة الحالية في الكشف عن تعبير مورثات الصدمة الحرارية وعوامل النسخ باعتماد التفاعل التضاعفي الكمي Quantitative PCR الذي برهنت نتائجه زيادة نشاط المورث مع زيادة شدة الصدمات ومدة التعريض متزامنة مع زيادة تراكيز الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA والحاض النووي الرايبوزي RNA.

وبرهنت نتائج الدراسة الحالية تأثير صدمة الموجات فوق السمعية في تعبير المورثات لعوامل النسخ *HSF* (Heat Shock Factors) بصورة سلبية بالرغم من زيادة تردد التعبير الجيني لمورثات بروتينات الصدمة *HSP*70 و *HSP*90 مما يؤشر ضرورة الحد من استعمال الموجات فوق السمعية لمدد طويلة.

وقد حدد تسلسل القواعد النتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص – Specific PCR في ثلاثين عينة منتخبة من كالس الأجنة والسيقان تحت الفلقية المعرضة لصدمات فيزيائية الكشف عن مورثات *HSP70* و *HSP90* وتبين أن حزم DNA ، المنقى من كالس الحمص مطابقة للمورثات في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) استجابة لفعل الصدمات الفيزيائية وأيضاً حصول العديد من الطفرات التي تباينت تأثيراتها في نوع الأحماض الأمينية التي ساهمت في تحديد بروتينات الصدمة الحرارية، وأكدت بيانات الشجرة الوراثية وجود صلة تقارب بين صنف الحمص قيد الدراسة والأصناف الهندية والمصرية المسجلة في NCBI (مرفقة) باعتماد الأدلة الجزيئية متمثلة بمورثات بروتينات الصدمة الحرارية. وتم لأول مرة تسجيل عشرون جيناً لبروتينات الصدمة الحرارية *HSP*70 و *HSP*90 وباسم (AnJa) لعينات كالس الحمص المحلي *Cicer arietinum* L. المعرضة للصدمات الفيزيائية بعد مراسلات المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية NCBI والحصول على رقم الانضمام التعريفي Accesion No. وأصبح مرجعاً للعراق والشرق الأوسط والعالم وفقاً للمعرف ID.

وأكدت نتائج الدراسة الحالية احتفاظ نباتات الحمص الناتجة من الكالس المعرض للصدمة بعلاقتها التعايشية مع بكتريا *Mesorhizobium* في زيادة تركيز الأحماض الأمينية في نباتات الحمص الناتجة من كالس الأجنة والسيقان تحت الفلقية والمعززة بأفضل معاملات الصدمات الحرارية والبرودة والموجات فوق السمعية مع النباتات غير الملقحة، فقد تفوقت نباتات الحمص الملقحة بأعداد العقد الجذرية البكتيرية الناتجة وزيادة محتوى البروتين والكلوروفيل الكلي والأوزان الرطبة لنباتات الحمص الملقحة.

Summary

The present study detected the gene expression of heat shock proteins *HSP*70, *HSP*90 genes and heat transcription factors *HSF*s in callus cultures of *Cicer arietinum* L. exposed to abiotic shocks. Murashige and Skoog (MS) medium was provided by 1.0 mg L^{-1} naphthalene acetic acid (NAA) and 2.0 mg L^{-1} benzyl adenine (BA) support of building up heat shock proteins *HSPs* which participate in producing chickpea plants tolerant to heat, cold and Ultrasound shocks, and its reflections on protein content, fresh weight, specific activity of hydrogen peroxide and oxidized fats.

Embryogenic callus intiation was characterized by the ease and speed of it's induction and development to produce compact callus from whole embryos and friable callus from half embryos on the same MS medium, as compared to callus. The best medium for shoot regeneration was 0.5 mg L^{-1} Thidiazuron (TDZ) with a percentage of 100% for embryonic callus and 76.6% for hypocotyl stem callus. The regenerated shoots were characterized by their dense growth and short stems, while the differentiation medium MS supplemented with an addition of 0.5 mg L^{-1} Kinetin (Kin) and 5.0 mg L^{-1} IAA supported the differentiation of shoots that was characterized by its elongation and stem diameter. Decreasing sucrose concentration added to the above mentioned medium encouraged the occurrence of the vitrification phenomenon, and the rooting of the regenerated shoots at the same time period involved

Data indicate that high concentrations of TDZ stimulated somatic embryo-like structures which failed to form the whole plants on MS0 medium.

The regenerated chickpea plants were adapted after the successful rooting in 1/2MS medium that contains 1.5 mg L^{-1} NAA and 4.0 mg L^{-1} IBA decreasing sucrose concentration to 10 g L^{-1}.

The results of the current study reflected the supporting role of short-term (5,10 minutes) and long-term (15,20 minutes) heat shock increases each of fresh weight and protein content of the callus.

The hypocotyl stem callus led to a significant increase in its content of proteins coupled with an increase in the activity of H_2O_2 and Malondialdehyde (MDA) in response to heat shock. This was reflected in an increasing growth fresh weight of callus.

Exposing the callus to a cold shock (0℃) for 20 minutes sustained the bio-mass of callus and its protein content with increasing levels of H_2O_2 and MDA. As well as ultrasound wave 47.6 KHz with exposure periods of 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 minutes increased the bio-mass of callus, its protein content and levels of MDA. It was found that the exposing duration 40 minutes was the most appropriate to enhance cellular activities of callus. The results indicated low levels of total chlorophyll content in all samples of callus exposed to the physical shocks.

The current study found that the best medium for the establishment of cell suspension cultures is based on mannitol as a carbon source, instead of sucrose. This is in the liquid MS medium supplemented with the addition of 1.0 mg L^{-1} NAA and 2.0 mg L^{-1} BA. Data exhibit the ability of cells to start their first division and subsequent divisions. To reach 45×10^4 cells/ml and 34×10^4 cells/ml at the 4^{th}. Day of culturing of embryonic and hypocotyl stem calli density of cell suspension cultures, derived from embryogenic and hypocotyl stem calli were 45×10^4 cells /ml

and 34×10^4 cells/ml respectively. Cultures of the above mentioned densities in agar drops. By promoting the formation of numerous colonies, most of these colonies were developed into callus primordia subsequently they produce callus cultures.

Exposing cell suspensions of embryos to 40°C/20 min. heat shock was encouraged colony formation and numbers of callus primordia that approached 184 primordia/drop and shock 35°C/15 minutes The production of 124 primordium / drop in case of cell suspension of hypocotyl stem callus. The later was developed to callus cultures. Similarly, exposing embryogenic cell suspension and hypocotyl stem cell suspension to ultrasonic shock at for short durations ranged from 1-5 min. stimulated divisions of cells and formation of callus primordia at 2 and 3 min. recording rates of 92-100%. The supporting role of these shocks enhances cellular activity continuities in callus derived from cell suspensions. Data showed that zero celsius exposed cells were failed to continue their division due to their exposition to cold shock moreover colony formation and their development into callus primordia was faild.

Obviously, these results enhanced the tolerance of chickpea callus to abiotic stresses (high and low temperatures and ultrasonic sound waves). Additionally, induced the heat shock factors *HSF* genes to produce readily heat shock proteins *HSP70* and *HSP90* to remove the damaged proteins and avoid apoptosis, the expression activity of heat shock genes and transcription factors were basically determined on the quantitive polymerase reaction qPCR. Again, it was found that gene activity increased with the increase of shock intensity coupled with the duration of exposure simultaneously with the increase in the recorded RNA and DNA concentrations.

Ultrasound shock affected the genetic expression of chickpea *HSF* transcription factors negatively despite the increased expression levels of shock protein *HSP*70 and *HSP*90 genes, which recomends the limitation of ultrasonic use of long duration.

The sequence of nitrogen bases of the products of the specific replication reaction was determined by PCR for thirty samples selected from embryogenic callus, hypocotyledonous stem callus exposed to physical shocks. Specific mutations in the sequence of nitrogenous bases as a response to physical shocks, and the genetic tree confirmed the existence of a link approximately 99% of the chickpea cultivars in this study and registered in National Center for Biotechnology Information NCBI (Enclosed).

The *Cicer arietinum* heat shock protein 70 (*HSP*70) gene and heat shock protein 90 (*HSP*90) gene were registered after the correspondence of the National Center for Biotechnology Information and obtained accession number and became a reference to Iraq, Middle East and the world. Ongoing work will add to this set as more type strains are publishedand it is available for download at ID:

OL321762 ; OL321763 ; OL321764 ; OL321765 ; OL321766 ; OL321767 ; OL321768 ; OL321769 ; OL321770 ; OL321771 ; OL321772 ; OL321773 ; OL321774 ; OL321775 ; OL321776 ; OL321777 ; OL321778 ; OL321779 ; OL321780 and OL321781.

Interestingly, the results indicated that chickpea plants produced from all callus cultures retain its capability of fixing atmospheric N_2 as inoculated with *Mesorhizobium ciceri*.

University of Mosul
College of Education
for Pure Science

Detection of Heat Shock Gene Proteins HSP_{70}, HSP_{90}, Heat Transcription Factors HSF_s and their Genetic Expression in Callus of Chickpea *Cicer arietinum* L.

Anwar Fakhri Dhanun Hammoudi

Ph.D. Thesis
Biology

Supervised by

Prof.
Dr. Jamella Hazaa Rasheed

2022 A.D **1443 A.H**