تقدير التعبير الجيني بتقنية العرض التفريقي لأصناف من البطاطا *Solanum tuberosum* L. المزروعة خارج الجسم الحي تحت اجهاد الجفاف

تقى رضا نور[1]، راضي ذياب عبد[2*]، شذى عايد يوسف[3]

[1] دائرة فحص وتصديق البذور، وزارة الزراعة، بغداد، العراق.

[2] قسم التقانة الأحيائية، كلية العلوم التطبيقية، جامعة الفلوجة، الفلوجة، العراق.

[3] دائرة البحوث الزراعية، العلوم والتكنولوجيا، بغداد، العراق.

المستخلص

نفذت تجربة مختبرية في قسم الهندسة الوراثية– لدائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنلوجيا للمدة بين شهر اذار 2019 وحتى شهر مايس 2020 بهدف تمييز التعبير الجيني تحت مستويات مختلفة من شد الجفاف. زرعت العقل الساقية في وسط MS مضاف له ثلاثة تراكيز 0 و0.5 و2.5% من الاثلين متعدد الكلايكول (PEG) كعامل اجهاد. استخدمت تقنية العرض التفريقي لتشخيص تباينات التراكيب الوراثية وارتباطها مع قابلية تحمل شد الجفاف باستخدام ستة بوادئ هي B5 وD2 وE12 وF12 وQ16 وH9. اختبرت سبعة تراكيب وراثية من البطاطا أربعة منها أصناف معتمدة في العراق هي ارنوفا وبورين وريفيرا وبروفنتو في حين تم الحصول على التراكيب الوراثية المتبقية من معهد البطاطا العالمي في بيرو وهي 58 و60 و67. اعطت جميع البوادئ المستخدمة تعددية شكلية بين المواقع المدروسة، اذ نتج عن استخدام هذه البوادئ عدد من الحزم بلغ 101 حزمة جميعها اعطت تعددية شكلية، مما يشير الى احتمال وجود تغايرات في التعبير الجيني في النباتات المعرضة لشد الجفاف. تباينت البادئات في عدد الحزم وكان اقل عدد حزم في البادئ D2 والذي اعطى 15 حزمة، اما اعلى عدد حزم فبلغ 18 في تفاعل البوادئ B5 وF12 وH9. لوحظ وجود عدد من الحزم لجميع البادئات المدروسة في النباتات النامية المعرضة وغير المعرضة لشدود الجفاف مما يشير الى احتمال علاقة تلك الحزم بصفات تحمل الجفاف.

الكلمات المفتاحية: التعددية الشكلية، العرض التفريقي، بطاطا، تعبير جيني.

Estimation of Gene Expression by Differential Display Technique of Potato Cultivars *(Solanum Tuberosum* L.) Grown in vitro Under Drought Stress

Tuqa R. Noor[1], Radhi D. Abed[2*], Shatha A. Yousif[3]

[1] Seed Inspection and Certification Directorate, Ministry of Agriculture, Baghdad, Iraq.

[2] Department of Biotechnology, College of Applied Sciences, University of Fallujah, Fallujah, Iraq.

[3] Agricultural Research Directorate, Science and Technology, Baghdad, Iraq.

Abstract

A laboratory experiment was carried out at Genetic Engineering Department- Agricultural Research Directorate/ Ministry of Science and Technology for the period between March 2019 and May 2020. The aim was to characterize the gene expression at different rates of drought stress. Stem cuttings were cultured in MS medium which contained three concentrations of Poly Ethylene Glycol (PEG) as a stress factor (0, 0.5 and 2.5 %). Differential Display Reverse Trancrptase-DDRT was applied to study the genetic markers related with drought tolerance by using 6 randomized primers (B5, D2, E12, F12, Q16 and H9). The experiment included seven genotypes of potatoes, four of which were certificated in Iraq, namely Arnova, Burren, Provento and Riviera and the rest were brought from the International Potato Institute in Peru which are 58, 60 and 67**.** All primers (6 primers) gave a polymorphism, with a total of 101 bands. Maybe this indicate the existence of gene expression in plants that subjected to drought stress. The primers varied in number of bands, the lowest number of bands were in D2 which gave 15 bands while the highest number of bands (18 bands) were in B5, F12 and H9. A number of bands of all primers studied were observed in plants under control and drought stresses, indicating the possibility of these DNA fragments involved in drought tolerance.

Key words: differential display, gene expression, polymorphism, potato.

المقدمة

يعد الجفاف مشكلة كبيرة تحد من زراعة المحاصيل ومنها البطاطا كونه ذو تأثير سلبي على الصفات المظهرية والفسيولوجية مثل انقسام الخلايا واستطالتها وطول النبات ومساحة أوراقه ثم انخفاض حاصله (Duresa واخرون، 2018). ان تحمل الجفاف ليس اجهادا مفردا او بسيطا ولكنه صفة معقدة تهيأ النبات لمقاومة عدد من الاجهادات الأخرى (Whitmore و Whalley، 2009). وهناك عوامل عديدة تؤدي الى صعوبة فهم آليات تحمل الجفاف منها عدم التأكد من وقت الجفاف وطول مدته ومقدار شدته والتي ازدادت بفعل التغير المناخي (Hosseinizadeh واخرون،

*Corresponding author.
Email: dr.radhidheyab68@uofallujah.edu.iq
https:// 10.36531/ijds.2023.139093.1031
Received 5 July 2023; Received in revised form 30 July 2023; Accepted 15 August 2023

2015 و Jenkins و Warren، 2015). على الرغم من توفر الطرائق المستعملة على المستوى الخلوي في تشخيص تحمل الجفاف، اتبعت في السنوات الاخيرة بعض الطرائق على المستوى الجزيئي ضمن تطبيقات تقانات الهندسة الوراثية. تؤدي المؤشرات الجزيئية دورا رئيسا في دراسة التباين والتنوع الوراثي فضلا عن التشخيص الجزيئي لمصدر مقاومة الاجهادات الحيوية وغير الحيوية. حينما تتعرض النباتات لشدود بيئية يتم حث أنظمة او آليات لحماية الخلية او النبات من خطر تلك الشدود البيئية، اذ يتم تنظيم تلك الآليات الخلوية عن طريق تغيير مستويات التعبير للجينات المسؤولة عن التحمل (Byun واخرون، 2007) الا انه وجدت صعوبات في دراسة تلك الجينات وذلك لارتباط آلية التحمل بمجموعات كبيرة من الجينات الثانوية. ان مواقع الجينات الكمية المرتبطة بتحمل الجفاف في النبات والمنتشرة في جينومه ما تزال آلية تنظيمها وتداخلها على المستوى الجزيئي غير واضحة تماما لان الجينات هي جزء من شبكات كثيرة ويكون فعلها مشتركا (Ambrosone واخرون، 2017 و Pieczynski واخرون، 2018). وعندما درست التغايرات بين تراكيب وراثية من البطاطا على المستوى الجزيئي وتحت اجهاد الجفاف، وجد Nasiruddin واخرون (2005) اختلافا في تناسق حزم الدنا في التراكيب الوراثية المختبرة والذي يعكس تباين تلك التراكيب على المستوى الجيني من حيث تحملها للجفاف. ولتحليل الاختلافات في التعبير الجيني للنباتات المتحملة للشدود البيئية، استخدمت عدة تقانات منها تقانة العرض التفريقي Differential Display Reverse Transcriptase–DDRT (Al–Kazaz، 2001 و Liang، 2002) التي يتم فيها دراسة انماط التعبير الجيني في تجارب تتضمن تعريض النباتات الى ظروف الشد البيئي ومقارنتها مع تلك التي لم تتعرض لتلك الشدود (Fislage واخرون، 1997 و Alves واخرون، 1998) والتي تستند على عدد من الخطوات وهي الانتساخ العكسي للرنا المرسال mRNA لتحويله الى الدنا المكمل (cDNA) والتضاعف بتفاعل البلمرة المتسلسل PCR للدنا المكمل، ثم الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة باستخدام هلام البولي اكريلامايد او هلام الاكروز (Al–Kazaz، 2001 و Liang و Pardee، 1992). اختبر Sabbah (2013) تقانة العرض التفريقي في صنفي الحنطة دجلة (متحمل للملوحة) وتموز 2 (حساس للملوحة) وباستخدام 8 بوادئ عشوائية، اظهرت نتائج الدراسة ان ثلاث بادئات كان لها تعبير تفاضلي في الصنف المتحمل للملوحة مما يشير إلى مدى ملاءمة البادئات في تحديد تحمل الملوحة في الحنطة. بين Hadi واخرون (2019) كفاءة تقانة العرض التفريقي في الكشف عن التغايرات بين سلالات السذاب ruta المستحدثة من زراعة الكالس النامي في اوساط معرضة لشدود ملحية وجفاف، واظهرت البوادئ OPA–1 و OPA–08 و OPA–11 و OPA–17 كفاءتها في دراسة التعبير الجيني لتلك السلالات مقارنة بالبوادئ الاخرى المستخدمة في الدراسة. يهدف البحث الى تشخيص التغاير الوراثي المؤدي الى تحمل الجفاف على المستوى الجزيئي في عدد من التراكيب الوراثية من البطاطا المعتمدة وغير المعتمدة في العراق.

المواد وطرائق العمل

نفذت التجربة في المختبرات التابعة لقسم الهندسة الوراثية–دائرة البحوث الزراعية / وزرة العلوم والتكنولوجيا للمدة بين شهر اذار 2019 وحتى شهر مايس 2020 لدراسة تأثير الجفاف في سبعة تراكيب وراثية من البطاطا (اربعة اصناف معتمد زراعتها في العراق وهي ارنوفا وبورين وبروفنتو وريفيرا وثلاثة تراكيب وراثية تم الحصول عليها من معهد البطاطا العالمي في بيرو وهي بالرموز 58 و60 و67). تم زراعة العقل الساقية من نباتات مكثرة سابقا بطريقة زراعة الانسجة في الوسط الغذائي MS (Murashige و Skoog، 1962) مع ثلاثة تراكيز من الاثيلين متعدد الكلايكول (PEG) وهي 0 و0.5 و2.5%. تم استخلاص RNA من النباتات المعرضة لشد الجفاف وغير المعرضة له باستخدام محلول الاستخلاص TRI bioneer regent RNAExtraction total AccuZolTM sure من شركة بايونير (Bioneer) الكورية وحسب الطريقة المثبتة من قبل الشركة ثم اجري ازالة الدنا (DNA) من RNA باستخدام العدة RQ1 RNase– Free DNase sKit من شركة بروميكا Promega وحسب الطريقة المثبتة من قبل الشركة. حسبت كمية الحامض النووي المستخلص والنقاوة بالاعتماد على قراءة جهاز النانو قطرة Nano–drops spectrophotometer، ثم عمل الانتساخ العكسي Reverse transcriptase لغرض تصنيع الدنا المكمل cDNA بالاعتماد على قالب الرنا المرسال mRNA باستخدام العدة الخاصة بالانتساخ Rocketscript TM Reverse Transcriptase Kit من شركة بروميكا Promega. قدر تركيز الدنا المكمل وحضرت محاليل قياسية للعينات. وللكشف عن الاختلاف في التعبير الجيني، اجري تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) باستخدام عدة خليط تفاعل البلمرة المتسلسل AccuPower® PCR PreMix kit من شركة بايونير الكورية، اذ تم اختبار عدد من البوادئ العشوائية Primers مصنعة في شركة بايونير الكورية وبحسب التتابعات الخاصة بشركة Operon. اضيف لكل انبوب ابندروف صغير (من عدة خليط تفاعل البلمرة المتسلسل) 12 مايكرولتر ماء و 100 نانوغرام من البادئ (1 مايكرولتر من المحلول الخزين للبادئ) مع 2 مايكرولتر من عينة الدنا المكمل ثم وضعت العينات في جهاز البلمرة المتسلسل ونفذ البرنامج التالي: 1–المسخ الأولي لشريط الدنا المكمل initial denaturation عند درجة حرارة 94مْ ولمدة 4 دقائق، 2– مسخ القالب denaturation عند درجة حرارة 94مْ ولمدة 1 دقيقة، 3– ارتباط البادئ annealing عند درجة حرارة 36مْ ولمدة 1 دقيقة، 4– الاستطالة extension عند درجة حرارة 72مْ ولمدة 1 دقيقة (تكرر الخطوات 2–4 بـ 35 دورة)، 5– الاستطالة النهائية final extension عند درجة حرارة 72مْ ولمدة 10 دقائق. ثم اجراء الترحيل الكهربائي لخليط تفاعل البلمرة المتسلسل (العينات) باستخدام هلام الاكاروز تركيز 1%، كما تم مع العينات ترحيل 6

مايكروليتر من مؤشر الدنا القياسي Ladder 100 pb DNA من شركة بايونير الكورية والذي تراوحت اوزانه الجزيئية 100– 2000 زوج قاعدي. قدرت احجام الحزم الناتجة باستخدام برنامج Photo capt لحساب الوزن الجزيئي molecular weight وهو أحد برامج الحاسوب الذي يمتاز بدقته في حساب أحجام الحزم الناتجة من تفاعلات البلمرة المتسلسل من خلال مقارنتها بحجم مؤشر الدنا القياسي الذي رحل مع العينات. حسبت النسبة المئوية للتعددية الشكلية والنسبة المئوية للمقدرة التمييزية والنسبة المئوية لكفاءة كل بادئ بحسب المعادلات الآتية كما أوردها Al–Judy و Majeed (2013).

النسبة المئوية للتعددية الشكلية= {(العدد الكلي لحزم البادئ)/(عدد الحزم المتباينة في البادئ)} × 100

النسبة المئوية للمقدرة التمييزية= {(عدد الحزم المتباينة للبادئ/(عدد الحزم المتباينة في كل البادئات)} × 100

النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ= (العدد الكلي كل البرايمرات)/(العدد الكلي لحزم البادئ) × 100

النتائج والمناقشة

إن استخدام تقانات المؤشرات الجزيئية في برامج التربية يمكن ان يساهم في كشف المصدر الجزيئي لمقاومة الإجهاد غير الحيوي (Krishna، 2002). لذلك قام العديد من الباحثين باستعمال تقنية العرض التفريقي لدراسة العديد من الصفات المظهرية والفسيولوجية لبعض المحاصيل الزراعية وتشخيص تبايناتها الوراثية وارتباطها مع قابلية تحمل الشدود البيئية.

نتائج عزل وتوصيف RNA من اصناف البطاطا المعرضة لإجهاد الجفاف

يبين (الجدول1) تراكيز RNA للعينات النباتية المزروعة في اوساط غذائية تحوي مستويات مختلفة من PEG. تراوح تركيز RNA بين 203 و767 نانوغرام مايكرولتر$^{-1}$ والنقاوة كانت بين 1.80 و2.06 نانوغرام مايكرولتر$^{-1}$مما يشير الى كفاءة الطريقة المستخدمة في استخلاص الحامض النووي حيث كانت الكميات ودرجة النقاوة مناسبة للخطوات اللاحقة.

جدول1. تركيز ونقاوة RNA المستخلص من اوراق تراكيب وراثية مختلفة من نبات البطاطا المعرضة لمستويات مختلفة من الاثيلين متعدد الكلايكول (PEG).

التراكيب الوراثية	تركيز PEG (%)					
	0		0.5		2.5	
	تركيز RNA (نانوغرام مايكرولتر$^{-1}$)	النقاوة	تركيز RNA (نانوغرام مايكرولتر$^{-1}$)	النقاوة	تركيز RNA (نانوغرام مايكرولتر$^{-1}$)	النقاوة
ارنوفا	267	2.02	504	1.80	448	1.94
بورين	576	1.94	357	2.03	234	2.06
بروفتو	212	1.98	335	2.05	200	2.04
ريفيرا	256	2.00	529	1.84	767	2.12
58	409	1.94	396	1.94	338	2.00
60	297	1.98	345	1.88	323	1.99
67	203	2.00	217	2.03	384	2.01

*Concentrations of RNA in ng/µl at three levels of PEG were within acceptable ranges. Purity values of RNA were closer to two. This is considered as the efficiency of the method used to extract RNA.

التعددية الشكلية للبواديء ومقدرتها التمييزية

اعطت جميع البوادئ المستخدمة تعددية شكلية بين المواقع المدروسة، اذ نتج عن استخدام هذه البوادئ عدد من الحزم بلغ 101 حزمة (جدول 2). وتباينت البادئات في عدد الحزم وكان اقل عدد حزم في البادئ D2 الذي اعطى 15 حزمة، اما اعلى عدد حزم فبلغ 18 حزمة فكانت في تفاعل البوادئ B5 و F12 و H9. سجلت خصائص المؤشرات بحساب النسبة المئوية للتعددية الشكلية والكفاءة والقدرة التمييزية لكل بادئ، واعطت جميع البوادئ نسبة مئوية من التباين او التعددية الشكلية وبلغت 100% بسبب ان عدد حزمها المتباينة مساوي لعدد حزمها الكلي. وسجلت اعلى نسبة مئوية للمقدرة التمييزية والنسبة المئوية لكفاءة البادئ بلغت 17.82 في تفاعل البوادئ B5وF12 و H9.

جدول2. النسبة المئوية للتعددية الشكلية والنسبة المئوية للتعددية الشكلية والنسبة المئوية لكفاءة البوادئ المستعملة مع سبعة اصناف بطاطا معرضة لمستويات من الاثيلين متعدد الكلايكول (PEG).

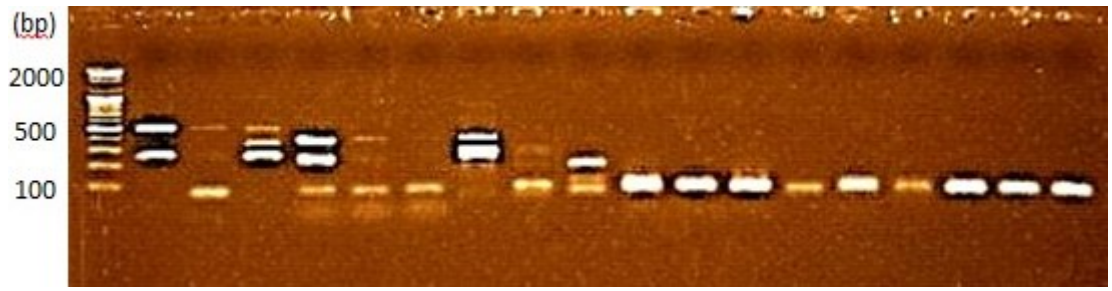
البوادئ	عدد حزم كلي	عدد حزم متباين	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	النسبة المئوية للمقدرة التمييزية	النسبة المئوية لكفاءة البادئ
B5	18	18	100	17.82	17.82
E12	16	16	100	15.84	15.84
D2	15	15	100	14.85	14.85
F12	18	18	100	17.82	17.82
Q16	16	16	100	15.84	15.84
H9	18	18	100	17.84	17.84
المجموع	101	101			

*Results in table 2 indicate that all primers gave a percentage of polymorphism that reached 100%. The highest percentage of discriminatory power and primer efficiency were recorded in the reaction of primers B5, F12, and H9.

تفاعل البوادئ في سبعة تراكيب وراثية من البطاطا

الصنف ارنوفا

ارتبطت البوادئ بالتتابعات المكملة لها في قالب الدنا المكمل cDNA، وتراوح عدد الحزم بين 4 حزم في تفاعل البادئ E12 (تحت التركيز 0% PEG) الى حزمة واحدة بحجم 100 زوج قاعدي في تفاعل البوادئ F12 وQ16 وH9 والتي ظهرت في النباتات النامية في الاوساط الغذائية تحت المستويات صفر و0.5 و2.5%PEG وفي البادئ D2 في النباتات النامية في الوسط 0.5%PEG (صورة 1). يلاحظ من نواتج التفاعلات اختفاء وظهور حزم في النباتات النامية في الوسط المعرض للإجهاد المائي مقارنة بالنباتات النامية بمعاملة المقارنة، اذ لوحظ ظهور الحزمة بالحجم 100 زوج قاعدي وبالحجم 400 زوج قاعدي في تفاعل البادئ B5 مع الدنا المكمل للنباتات النامية في المستويين 0.5 و2.5% PEG بالتتابع وحزمة بالحجم 100 زوج قاعدي وبالاحجام 100 و110 و250 زوج قاعدي في تفاعل البادئ D2 مع الدنا المكمل للنباتات النامية في وسط 0.5 و2.5% PEG على التتابع مقارنة مع النباتات النامية في معاملة المقارنة مما يشير الى احتمالية ارتباط تلك الحزم بتحمل الجفاف. اما بالنسبة لتفاعل البادئ E12 فيلاحظ اختفاء الحزمة بالحجم 250 زوج قاعدي في وسط الاجهاد المائي 0.5% PEG وبالحجم 250 و450 زوج قاعدي في النباتات النامية في وسط الاجهاد المائي 2.5% PEG مقارنة بالنباتات النامية في معاملة المقارنة. وكان عدد الحزم في تفاعل البوادئ F12 وQ16 وH9 متماثلا في النباتات النامية المعرضة وغير المعرضة لشدود الجفاف (حزمة بحجم 100 زوج قاعدي)، وايضا كانت الحزمة بالحجم 500 زوج قاعدي في تفاعل البادئB5 والحزمتان 50 و100 زوج قاعدي في تفاعل البادئ E12 موجودة في النباتات النامية المعرضة وغير المعرضة لشدود الجفاف مما يشير الى احتمال علاقة تلك الحزم بصفات تتأثر بالشدود البيئية.



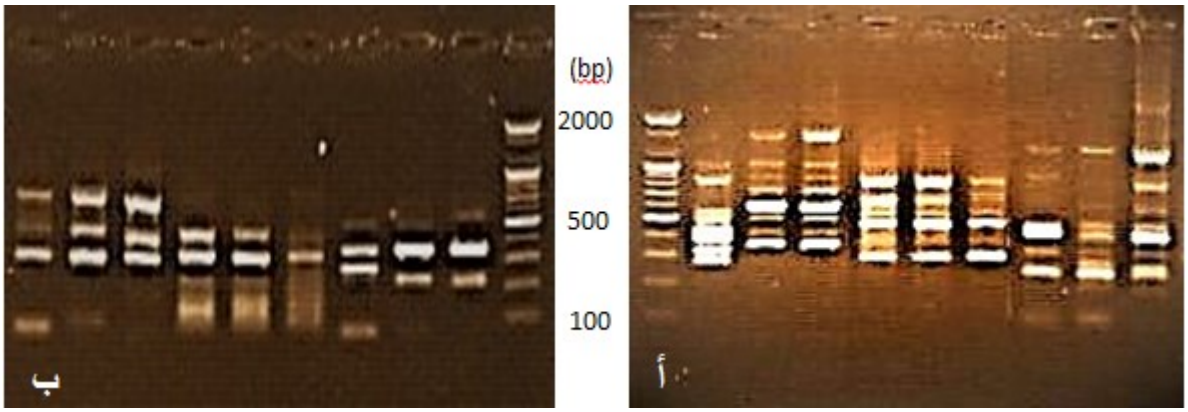
صورة1. تفاعل البادئB5 وD2و E12 وF12 وH9 و Q16 مع الدنا المكمل cDNA للصنف ارنوفا، من اليسار الى اليمين: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، B5 مع 0 و0.5 و2.5 % PEG بالتتابع، E12 مع 0 و0.5 و2.5 % PEG بالتتابع، D2 مع 0 و0.5 و2.5 % PEG بالتتابع، F12مع 0 و0.5 و2.5 % PEG بالتتابع، H9 مع 0 و0.5 و2.5 % PEG بالتتابع، Q16 مع 0 و0.5 و2.5% PEG بالتتابع.

* Among the products of the PCR reactions of primers, it is observed that bands disappear and appear in Arnova plants growing under water stress compared to plants growing under the control treatment.

الصنف بورين

تراوحت احجام الحزم عند تفاعل البوادئ مع الدنا المكمل للصنف بورين بين 100 و1600 زوج قاعدي (صورة 2أ و2ب). كانت هناك حزم متماثلة وجدت في النباتات النامية في معاملة المقارنة وفي مستويي الشد المائي 0.5 و2.5% PEG، اذ اظهر البادئB5 حزما بالحجم 400 و

800 و1000 زوج قاعدي والبادئ E12 حزمة بحجم 350 زوج قاعدي وفي البادئ D2 كانت جميع الحزم موجودة في جميع النباتات المدروسة ووجدت 3 حزم (بحجم 100 و300 و400 زوج قاعدي) وحزمتان (بحجم 300 و 600 زوج قاعدي) و 4 حزم (250 و 300 و400 و1300 زوج قاعدي) في جميع النباتات في البوادئ F12 وQ16 وH9 بالتتابع مما يشير الى احتمال علاقة تلك الحزم بصفة تحمل الجفاف. ويلاحظ غياب حزم في النباتات النامية في معاملة المقارنة وظهورها في النباتات النامية في وسط غذائي يحوي 0.5 و/او 2.5% PEG لجميع البوادئ باستثناء البادئان D2 وQ16، فقد ظهرت خمس حزم في البادئB5 (350 و480 و600 و700 و1600 زوج قاعدي) وحزمة واحدة بأحجام 500 و200 و450 زوج قاعدي للبواديء E12 وF12 وH9 على التتابع مما يشير الى احتمالية ارتباط تلك الحزم بتحمل الجفاف. كما يلاحظ ان هناك اختلاف في نسق الحزم في النباتات النامية في وسط غذائي يحوي على 0.5% PEG مقارنة بالنباتات النامية في وسط غذائي يحوي على 2.5% PEG لجميع البواديء المدروسة بأستثناء البادیء D2.



صورة2. تفاعل البوادئ B5 وD2 وE12 وF12 وH9 وQ16 مع الدنا المكمل cDNA للصنف بورين. أ. من اليسار الى اليمين: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، B5 مع 0 و0.5 و2.5 % PEG بالتتابع، D2 مع 0 و0.5 و2.5 %PEG بالتتابع، H9 مع 0 و0.5 و2.5%PEG بالتتابع. ب. من اليمين الى اليسار: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، E12 مع 0 و0.5 و2.5% PEG بالتتابع،F12 مع 0 و0.5 و2.5 %PEG بالتتابع، Q16 مع 0 و0.5 و2.5%PEG بالتتابع.

*Presence or absence of a particular band can be assessed for Burren plants grown in medium containing 0, 0.5 and 1% PEG.

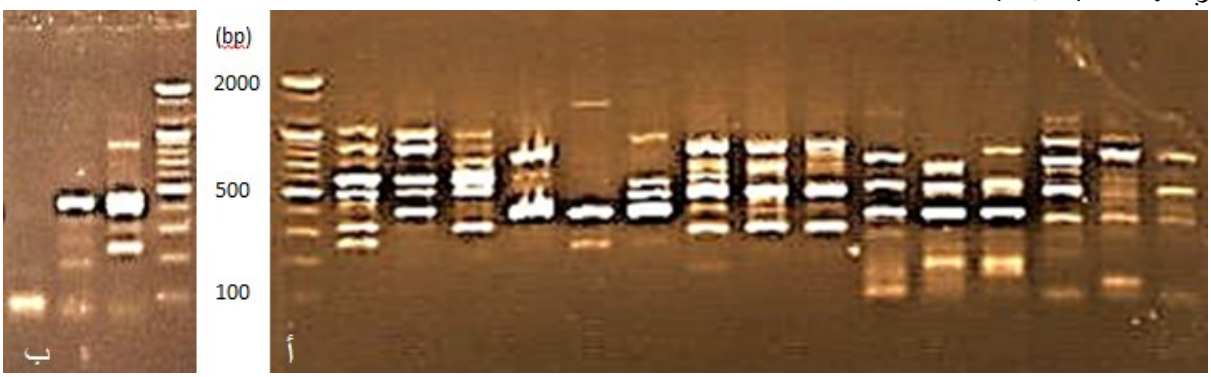
الصنف بروفنتو

ميز البادئB5 عدد من الحزم المتواجدة في النباتات النامية تحت جميع مستويات PEG وأعطى حزما بلغت 500 و600 و1000 زوج قاعدي. كذلك ميز البادئان E12 وF12 حزمة بالحجم 380 زوج قاعدي عند التفاعل مع الدنا المكمل للنباتات النامية في جميع مستويات PEG. اما بالنسبة للبادئ D2 فكانت جميع الحزم موجودة في جميع النباتات باستثناء حزمة بحجم 620 زوج قاعدي والتي ظهرت فقط في النباتات النامية في معاملة المقارنة. وظهرت حزمتان بحجم 120 و350 زوج قاعدي وحزمة بحجم 100 زوج قاعدي عند تفاعل البادئ Q16 وH9 بالتتابع مع الدنا المكمل للنباتات النامية في جميع المعاملات مما يشير الى احتمالية ارتباط تلك الحزم بمقاومة الجفاف نتيجة ظهورها في النباتات المعرضة وعير المعرضة للشد المائي. ومن ناحية أخرى، ظهرت حزمتان بالموقع 150 و800 زوج قاعدي عند تفاعل البادئQ16 مع الدنا المكمل للنباتات المعرضة للإجهاد المائي 0.5 %PEG وحزمة بالموقع 800 زوج قاعدي عند تفاعل البادئQ16 مع الدنا المكمل للنباتات المعرضة للإجهاد المائي 2.5% PEG (صورة 3أ و3ب) في حين لم تكن هذه الحزم موجودة في النباتات النامية في معاملة المقارنة (0 % PEG).

الصنف ريفيرا

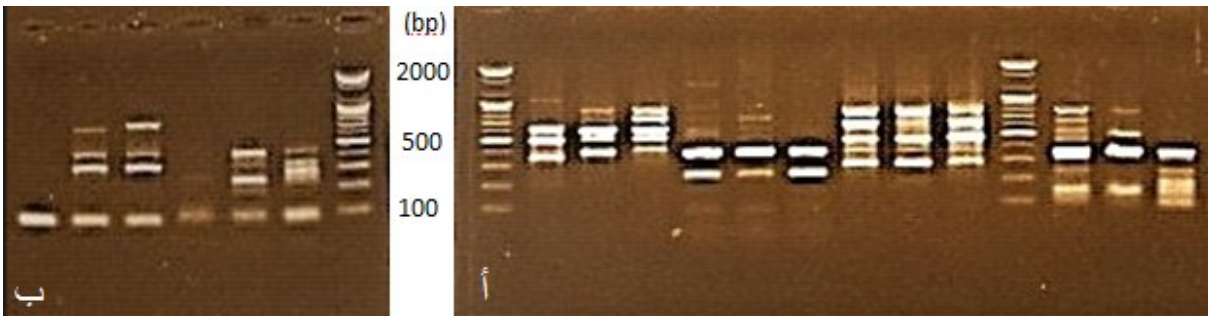
تم مضاعفة الدنا المكمل للعينات المدروسة باستخدام ستة بوادئ ويتبين في الصورة (4أ و4ب) ظهور حزم التضاعف والتي توزعت في عدد من المواقع وتراوحت احجامها بين 100 و1000 زوج قاعدي. ميز البادئB5 حزمة بالحجم 500 زوج قاعدي في جميع النباتات سواء المعرضة وغير المعرضة للشد المائي، في حين كانت الحزم المتشابهة في جميع النباتات لبقية البوادئ بحدود 220 و360 زوج قاعدي لتفاعل البادئE12 والحزم بالحجم 280 و380، 480 و500 و630 و900 زوج قاعدي في تفاعل البادئD2والحزمتان 150 و350 زوج قاعدي في البادئ F12 والحزمة 100 زوج قاعدي في البادئ Q16 والبادئ H9. ومن ناحية اخرى ظهرت حزمتان بالحجم 800 و1000 زوج قاعدي عند تفاعل البادئ

B5 مع الدنا المكمل للنباتات المعرضة للجهد المائي 0.5 و2.5 %PEG، وحزمة بالحجم 800 زوج قاعدي وحزمة بالحجم 250 زوج قاعدي عند تفاعل الباديء E12 وH9 بالتتابع مع الدنا المكمل للنباتات المعرضة للشد المائي 0.5% PEG الامر الذي يثير الاهتمام لكون هذه الحزم ربما لها علاقة بتحمل للجفاف.



صورة3. تفاعل البوادئ B5 وD2 و E12 F12 و Q16 و H9 مع الدنا المكمل cDNA للصنف بروفنتو. ا. من اليسار الى اليمين: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، B5 مع 0، 0.5، 2.5 % PEGبالتتابع، E12 مع 0، 0.5، 2.5 %PEG بالتتابع، D2 مع 0 و0.5 و2.5 %PEG بالتتابع، F12 مع 0 و0.5 و2.5 %PEG بالتتابع، Q16 مع 0 و0.5 و2.5 %PEG بالتتابع. ب. من اليمين الى اليسار. الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، البادئ H9 مع 0 و0.5 و2.5 %PEG بالتتابع.

*Photo 3 shows a number of bands appeared in plants exposed to drought stress and in plants grown under control treatment, which indicates that these bands are related to drought tolerance in Provento variety.



صورة4. تفاعل البوادئ B5 وD2 و E12 وF12 و Q16 و H9 مع الدنا المكمل cDNA للصنف ريفيرا . أ. من اليسار الى اليمين: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، B5 مع 0 و 0.5 و 2.5%PEG بالتتابع، E12 مع 0 و 0.5 و 2.5%PEG بالتتابع، D2 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، F12 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع. ب. من اليمين الى اليسار: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، H9 مع 0 و 0.5 و 2.5%PEG بالتتابع، Q16 مع 0 و0.5 و2.5% PEG بالتتابع.

* Photo 4 shows the appearance of bands in Rivera plants under drought stress, while these bands did not appear in the control plants for B5, E12 and H9 primers which indicates the possibility of a relationship between these bands and drought resistance.

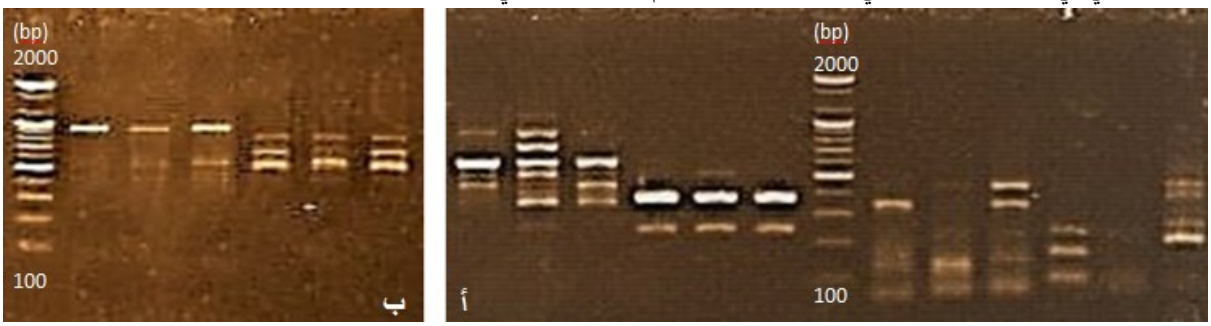
التركيب الوراثي 58

تروحت احجام الحزم للبوادئ بتفاعلها مع الدنا المكمل للتركيب الوراثي 58 بين 50 و950 زوج قاعدي (صورة 5 أ و5ب)، وظهرت حزم مشتركة في جميع النباتات النامية سواء النامية في معاملة المقارنة او تحت مستويي الشد المائي (0.5 و2.5% PEG)، فقد كانت هناك حزمتان بالحجم 500 و600 زوج قاعدي في البادئB5 وحزمتان (250 و370 زوج قاعدي) بالنسبة للبادئE12 وجميع الحزم في البادئD2 وحزمتان بالحجم 500 و900 زوج قاعدي في البادئQ16 مما يشير الى احتمالية ارتباط تلك الحزم بتحمل الجفاف. اما في البادئH9 فلم يكن هناك تفاعل بالنسبة للدنا المكمل للنباتات النامية في المستوى0.5% PEG.

التركيب الوراثي 60

لم يكن هناك أي تفاعل فيما يخص الدنا المكمل للتركيب الوراثي 60 مع البادئB5 في جميع النباتات النامية في وسط النمو بوجود او عدم وجود الشد البيئي وايضا فيما يخص البادئE12 ، اذ كان هناك فقط تفاعل بين البادئ وبين النباتات النامية في وسط يحتوي 0.5% PEG والذي نجم عنه حزمة بموقع 400 زوج قاعدي، في حين ظهرت ثلاث حزم مشتركة فيما يخص تفاعل البادئD2 مع الدنا المكمل لجميع النباتات النامية في معاملة المقارنة والنامية في مستويي الشد المائي 0.5 و2.5%PEG، وحزمة بالحجم 510 زوج قاعدي في البادئ Q16 وثلاث حزم (250

و500 و900 زوج قاعدي) فيما يخص تفاعل البادئH9 (صورة 6) مما يشير الى احتمالية ارتباط تلك الحزم بتحمل الجفاف نتيجة عدم تغير التعبير الجيني في نباتات التركيب الوراثي 60 سواء بوجود او عدم وجود الشد المائي.



صورة5. تفاعل البوادئ B5 وD2 و E12 وF12 و Q16 و H9 مع الدنا المكمل cDNA للتركيب الوراثي58. أ. من اليسار الى اليمين: B5 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، E12 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، F12 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، H9 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع. ب. من اليسار الى اليمين: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، البادئD2 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، Q16 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع.

* The photo above shows the amplification profile of differential display using B5, D2, E12, F12, H9 and Q16 primers.

صورة6. تفاعل البوادئ B5 وD2 و E12 وF12 و Q16 و H9 مع الدنا المكمل cDNA للصنف 60 . من اليسار الى اليمين: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، B5 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع،E12 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، D2 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، F12 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، H9 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، Q16 2.5 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع.

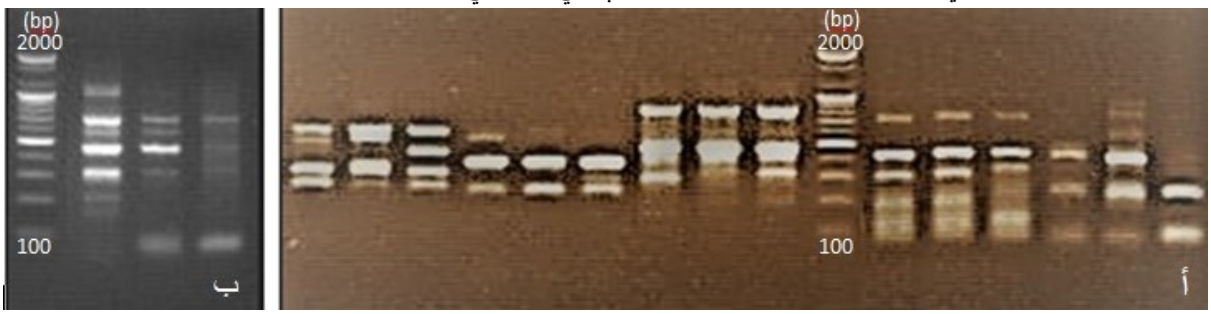
*The primers D2, Q16 and H9 showed their efficiency in gene expression, as bands appeared in plants (genotype 60) grown under water stress and in plants grown under control treatment, which indicates the possibility of these bands being linked to the genotype ability to tolerate drought.

التركيب الوراثي 67

كان هناك عدد من الحزم المشتركة بين النباتات النامية في اوساط مضاف اليها تراكيز PEG بمقدار صفر و0.5 و2.5%، ففي البادئ B5 كانت الحزم المشتركة بحجم 250 و380 و600 زوج قاعدي وحزمتان في البادئE12 (250 و380 زوج قاعدي) وجميع الحزم في البادئD2 و4 حزم فيF12 (100و 200 و400 و750 زوج قاعدي) وثلاث حزم بحجم 300 و440 و700 زوج قاعدي في البادئQ16 وفيما يخص البادئH9 ظهرت حزمتان مشتركتان في جميع النباتات بحجم 100 و250 زوج قاعدي (صورة 7أ و7 ب).

ان تقانة العرض التفريقي بوجود بوادئ عشوائية هي تقانة بسيطة استخدمت من قبل العديد من الباحثين (Al-Kazaz، 2001 وSabbah، 2013) لتشخيص ومعرفة الجينات المسؤولة عن تحمل الاجهاد البيئي في النباتات التي لا تتوفر عنها معرفة مسبقة بتلك الجينات. ويلاحظ من النتائج نجاح تقنية العرض التفريقي في تحليل الاختلافات في التعبير الجيني بالنسبة للنباتات النامية في مستويات مختلفة من شد الجفاف، اذ ظهرت واختفت بعض الحزم في النباتات المعرضة للإجهاد المائي مقارنة في النباتات النامية في معاملة المقارنة. واتفقت هذه النتائج مع نتائج دراسة Hadi واخرون (2019) والذين اشاروا الى كفاءة تقانة العرض التفريقي في الكشف عن التغايرات بين سلالات نبات السذاب النامية في اوساط معرضة للشدود البيئية من خلال كفاءة البوادئ العشوائية المستخدمة في الدراسة في كشف التغايرات في التعبير الجيني.

تعد صفة تحمل الجفاف من الصفات التي يسيطر عليها عدد كثير من الجينات polygenes لذلك بذلت جهود كبيرة في تحديد مواقع الصفات الكمية المرتبطة بصفات مظهرية او فسلجية لها علاقة بتحمل الجفاف وبالتالي تأثيرها في صفات الحاصل ومكوناته.



صورة7. تفاعل البوادئ B5 وD2 و E12 وF12 و Q16 و H9 مع الدنا المكمل cDNA للصنف 67 . أ. من اليسار الى اليمين: B5 مع 0 و 0.5 و 2.5%PEG بالتتابع، E12 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، D2 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع، الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، F12 مع 0 و 0.5 و 2.5%PEG بالتتابع، H9 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع. ب. من اليسار الى اليمين: الدنا القياسي 100 زوج قاعدي، البادئQ16 مع 0 و 0.5 و 2.5% PEG بالتتابع.

* There were a number of bands shared between plants grown in media supplemented with of 0, 0.5, and 2.5% PEG indicating the possibility of these DNA fragments involved in drought tolerance.

توجه الباحثون حاليا بدارسة المؤشرات الجزيئية من أجل تشخيص الجينات المرتبطة بصفات تحمل الشدود البيئية حتى إذا تم تشخيصها يكون من السهولة استخدامها في انتخاب الصنف الأفضل لتلك الظروف البيئية. أن التعبير الجيني يشارك فيه عدد من الجينات المسؤولة عن العديد من المسارات الايضية في النباتات النامية تحت ظروف الاجهادات البيئية، اذ تتحفز جينات عند تعرض النبات للشدود البيئية لإنتاج بروتينات معينة كآليات دفاعية وبذلك تشارك هذه البروتينات في التخليق الحيوي لمركبات تكون مسؤولة عن التعديل الاوزموزي وتنظيم عمل انزيمات فضلا عن تفعيل عمل بروتينات تنظيمية (عوامل النسخ) والتي بدورها تؤثر في تنشيط أو إلغاء عمل بعض الجينات وبذلك يتأثر التعبير الجيني لها وينعكس ذلك على معدل نمو النبات (Yoshida واخرون، 1994و Kazaz، 2001 و Shahid واخرون، 2012).

الاستنتاج

يتبين من نتائج هذه الدراسة فعالية تقانة العرض التفريقي في تشخيص الاختلافات على مستوى الحزم بين اصناف البطاطا وعلى مستوى التعبير الجيني فيما يخص نباتات الصنف الواحد والمعرضة الى مستويات مختلفة من الشد البيئي. ان تشابه وجود الحزم نفسها حتى وان تغيرت مستويات شد الجفاف يدل ان لهذه الحزم مواقع جينات لها تأثير في تحمل الجفاف، فضلا عن ذلك فأن اختفاء حزم بأحجام مختلفة تحت مستوى المقارنة وظهورها مع مستويي شد الجفاف (0.5 و2.5 %PEG) له مؤشر واضح على علاقة هذه الحزم بمواقع جينات تحمل الجفاف.

References

Al-Judy, N. & Majeed, R. (2013). Morphological, biochemical, and molecular characterization of ten rhizobial bacteria isolates. *Iraqi journal of science*, 54(2),280-287.

AL-Kazaz, A. (2001). Isolation and characterization of a salt- induced transcript from halophyte *Spartina anglica* using a modified version of DDRT- PCR. PhD Thesis. College of Science, Nankai University, China.

Alves, J, VanToai, T. & Namik, K. (1998). Differential display: a novel PCR based method for gene isolation and cloning. Revista Brasileira. de Andreea, N., Mihaela, C., Nicoleta, C. & Monica, N. (2014). *In vitro* response to drought tolerance for different potato varieties. *Analele Universitaţii din Oradea, Fascicula Protecţia Mediului*, 257-262.

Ambrosone, A., Batelli, G., Bostan, H., D'Agostino, N., Chiusano, M., Perrotta, G., Leone, A., Grillo, S. & Costa, A. (2017). Distinct gene networks drive differential response to abrupt or gradual water deficit in potato. *Gene*, 597,30–39.

Byun, M.O., Kwon, H.B. & Park, S.C. (2007). Recent advances in genetic engineering of potato crops for drought and saline stress tolerance. In Jenks, M.A, Hasegawa, P.M. & Jain, M. (eds.) Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops. Springer, Dordrecht. pp. 713-737.

Duresa, O., Mohamed, C. & Teju. E. (2018). Genetic variability, correlation and path coefficient analysis in potato genotypes for yield, yield related traits and mineral contents at Haramaya. PhD thesis, Haramaya University, Ethiopia.

Fislage, R. Barchans, M., Humboldt, Y., Wendt, M. & Oberender, H. (1997). Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 25(9), 1830–1835.

Hadi, S. M., Ibrahim, K & Yousif, Sh. (2019). Differential expression for genes in response to drought and salinity in *Ruta graveolens* plantlets. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12(2), 203-207.

Hosseinizadeh, A., SeyedKaboli, H., Zareie, H., Akhondali, A. & Farjad, B. (2015). Impact of climate change on the severity, duration, and frequency of drought in a semi-arid agricultural basin. *Geoenvironmental Disasters*, 2(1),23.

Jenkins, K. & Warren R. (2015). Quantifying the impact of climate change on drought regimes using the Standardized Precipitation Index. *Theoretical and Applied Climatology*, 120(1),41–54.

Krishna, H.S. 2002. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances*, 20,239-266.

Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967- 971.

Liang, P. (2002). A decade of differential display. *Biology Techniques*, 33(2), 338-346.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, 15, 473-497.

Nasiruddin, K.M., Yasmin, S., Toma, S.M. & Crescenzi, A. (2005). Screening of potato germplasm against abiotic stress and molecular characterization by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis. *Acta Horticulture*, 684,143-150.

Pieczynski, M., Wyrzykowska, A., Milanowska, K., Boguszewska-Mankowska, D., Zagdanska, B., Karlowski, W., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2018) Genome wide identification of genes involved in the potato response to drought indicates functional evolutionary conservation with Arabidopsis plants. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2),603–614.

Sabbah, M. (2013). Differential screening of randomly amplified cDNAs using RAPD primers in salt tolerance and sensitive wheat. *Ibn Al-Haitham Journal for Pure & Applied Sciences*, 26(3), 43-48.

Shahid, M, Jamal, A., Rashid, B., Aftab, B. & Husnain, T. (2012). Identification and isolation of salt stress−responsive transcripts from *Gossypium arboretum* L. *Turkish Journal of Biology*, 36,746-756.

Whitmore, A. & Whalley, W. (2009) Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *Journal of Experimental Botany*, 60(10),2845–2857.

Yoshida, K, Naito, S. & Takeda, G. (1994). cDNA cloning of regeneration-specific genes in rice by differential screening of randomly amplified cDNAs using RAPD primers. *Plant Cell Physiology*. 35(7),1003-1009.