التحري بالطرائق الجزيئية عن جين *SKC1* المسؤول عن تحمل الاجهاد الملحي ودراسة التعبير الجيني في بعض الاصناف المحلية من الرز

ايمان نعمان اسماعيل اشواق شنان عبد

ضحى ميسر مجيد عبد الجاسم محيسن الجبوري

الملخص

يعدٌّ الرز من المحاصيل الحساسة للاجهاد الملحي لاسيما في مرحلة انبات البذور، وتتباين الأصناف فيما بينها بمقدار التحمل تبعاً لصفاتها الوراثية او محتواها الجيني. لذا هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن احد الجينات المهمة المسؤولة عن تحمل الرز لظروف الشد الملحي وهو جين (*SKC1*) في سبعة أصناف محلية من الرز هي:_ عنبر البركة، عنبر-33، ياسمين، فرات-1، بحوث، مشخاب-1 و مشخاب-2. عزل الحامض النووي الرايبوزي (**RNA**) من الأوراق الفتية لهذه النباتات بعد 45 يوما" من زراعتها في المستوى الملحي (15 ديسي سمنز/م)، فضلاً عن معاملة السيطرة (3 ديسي سمنز/م) و دراسة التعبير الجيني لهم باستخدام التقنية الجزيئية **SYBR Real time PCR**. اظهرت النتائج تفوق الصنفين مشخاب-1 ومشخاب-2 على سائر الاصناف في إعطائهم أعلى معدلا" في لقيم تعبير الجين ***SKC1*** المرتبط بصفة تحمل الملوحة مقارنة بسائر الاصناف المدروسة، اما الصنفين فرات-1وبحوث فيمكن اعتبارهما من الاصناف المتحملة نسبياً للملوحة او شبه المتحملة، وذلك لان قيم التعبير للجين ***SKC1*** كانت مرتفعة نسبيا مقارنة مع معاملة السيطرة، اما الاصناف التي اكدت التجربة حساسيتها للملوحة هم عنبرالبركة، عنبر-33 وياسمين، فأن مقدار التعبير الجيني فيهم لم يعط اختلافا" او تعبيراً محسوساً بعد تعرضه للشد الملحي مقارنة مع معاملة السيطرة.

المقدمة

يُعدّ الرز من المحاصيل الصيفية الاقتصادية المهمة في العراق خاصةً وقارة آسيا عامةً مقارنة مع سائر مناطق العالم، اذ تحتل اهميته الغذائية المرتبة الثانية بعد محصول الحنطة. وتعد الملوحة من اهم المشاكل الرئيسة التي تؤثر سلبيا" في نمو وانتاج هذه النباتات، إذ يعدّ محصول الرز.***Oryza sativa* L** من النباتات الحساسة للملوحة لاسيما في المرحلة المبكرة لنمو البادرات (2).كما ان لديه تبايناً وراثيا"كبيرا" بين أصنافه فيما يخص بامتلاك جيناته لصفة تحمل الملوحة (15). وتشير المصادر الى ان الاجهاد الملحي يتسبب في تأثيرات عديدة اهمها بطء نمو النبات وتغيير في الصفات النوعية للمحصول ونقص كميته بصورة تتباين وفقاً لدرجة حساسية النبات او مقدار تحمله للملوحة (3،11). وقد درس **Walia** وجماعته (15) تأثير هذا الإجهاد في فسلجه نمطين جينيين من الرز يختلفان في تحملهما للملوحة وكان تأثير كلوريد الصوديوم في خفض الكتلة الحيوية (الوزن الجاف) واضحا" من 24 ساعة بعد التملح، مما يشير إلى أن عواقب تراكم أيوني الصوديوم والكلور في أوراق كلا الخطين كانت سريعة، الاّ انّ مقدار النمو الجذري في النبات الحساس كان أقل بمقدار ثلاث مرات مقارنة بالنمط المتحمل. وتنشأ مشكلة الاجهاد الملحي عند زيادة نسبة الأملاح في التربة مما يؤدي الى سحب الماء المتاح للنبات، فضلاً عن ان زيادة الايونات الملحية لاسيما ايونات الصوديوم في العصارة النباتية يؤدي إلى اضطرابٍ في التوازن الايوني **ionic imbalance** داخل الخلية النباتية وزيادة السمية وغيرها من الأمور (4،9). وللتكييف مع الضغوط البيئية تمتلك النباتات عدداً من الآليات الفسلجية أهمها زيادة تخليق بعض أنواع البروتينات في النبات مثل البرولين، المحافظة على التوازن الأيوني داخل الخلية، القدرة على استبعاد الصوديوم الى المناطق الأقل فعالية أو حجزه داخل الفجوات

مركز بحوث تقانات الاحيائية ، جامعة النهرين، بغداد، العراق.

والحفاظ على امتصاص العناصر المفيدة مثل البوتاسيوم وغيرها من الفعاليات المهمة المرتبطة بجينات عديدة، إذ ان آلية التحمل للشد هي ناتجة من متلازمة مركبة **Complex Syndrome** عبارة عن تداخلات لأعداد كبيرة من الجينات تتحكم بعشرات الصفات المتباينة التأثير ومئات المركبات في النبات، إذ تتحكم هذه الجينات بمواقع الصفات الكمية **Quantitative trait loci (QTL)** المسؤولة عن آليات التحمل(**1**)، وتسمى بجينات البروتينات المتخصصة بالتحكم بأيونات الأملاح **Salt Overly Sensitive Proteins (SOS)** (**10**)، لهذا تختلف النباتات في مستوى تحملها للإجهاد الملحي بتباين تراكيبها الوراثية، وهذا ما اكده **Dai Yin** وجماعته (**6**) عند استخدامهم تقنية **cDNA microarray analysis** في دراسة هذه الجينات. ويعدُّ الجين***SKC1*** احد الجينات المهمة المسؤولة عن تحمل الاجهاد الملحي في الرز، فقد أشار **Ren** وجماعته (**12**) الى قدرة الجين ***SKC1*** في التعبير عن نفسه في الخلايا البارنكيمية المحيطة بأوعية الخشب وذلك بتخليق بروتينات متخصصة وظيفتها المحافظة على توازن ايون البوتاسيوم وتنظيم نسبة Na^+/K^+ من خلال انتخاب وطرح ايونات الصوديوم، كما يشفر هذا الجين لحماية نبات الرز من السمية المفرطة الناتجة من تراكم ايونات الهيدرونيوم **Hydronium ions** في ساق النبات واوراقه تحت ظروف الشد الملحي. وأظهرت عمليات البحث في قاعدة البيانات تشابها" كبيرا" يصل الى **44%** بين هوية البروتين المشفر من قبل ***SKC1*** في الرز وبروتين ***TaHKT1*** المسؤول عن بعض آليات تحمل الملوحة في الحنطة (**13**). كما تمكن **Zhou** وجماعته (**16**) من التعرف على جين تحمل الاجهاد الملحي والجفاف ***TaSTRG* gene** في نبات الحنطة باستخدام تقنية **Microarray analysis** ونقله الى نبات الرز بتقنية التحويل الوراثي **transformation** وقد نجح الجين في التعبير عن نفسه في نبات الرز المحور وراثيا" من خلال رفع معدل البقاء وزيادة الوزن الطري للمجموع الخضري وارتفاع محتوى الكلوروفيل فضلاً عن الزيادة المعنوية في تخليق الحامض الأميني البرولين. لذا هدفت دراستنا الحالية الى التقصي عن جين ***SKC1***المسؤول عن بعض آليات تحمل الملوحة في الرز ودراسة تعبيره الجيني في سبعة اصناف محلية مختلفة من الرز باستخدام التقنية الجزيئية **SYBR Real time PCR**، وتوظيف هذه المعلومات في دراسة الاصناف الاكثر تحمل للملوحة وبالتالي امكان تطوير وإنتاج أصناف جديدة من الرز الهجين تمتاز بقدرتها على تحمل الإجهاد الملحي ونقص المياه للمساهمة في تحسين الزراعة المحلية لهذا المحصول.

المواد وطرائق البحث

أجريت التجربة في مختبرات مركز بحوث التقانات الاحيائية/جامعة النهرين– بغداد، للمدة من **2015-2016**.

المادة النباتية

تم الحصول على بذور سبعة اصناف محلية مختارة من الرز ***Oryza sativa* L.** هي (عنبرالبركة، عنبر-**33**، بحوث، ياسمين، فرات-**1**، مشخاب-**1** و مشخاب-**2**) من الهيأة العامة لفحص وتصديق البذور/ وزارة الزراعة، وتمتازهذه البذور بتجانسها واستقرارها الوراثي فضلاً عن امتلاكها لصفات وراثية وإنتاجية جيدة.

تقويم تحمل أصناف الرز للإجهاد الملحي

تمت تنمية الاصناف السبعة من الرز في سنادين مغلقة تحتوي على تربة ذات مستويين ملحيين مختلفين، الأول بمستوى ملحي (**15** ديسي سمنز/م) والثاني خالي من الاضافة عدت معاملة سيطرة (**3** ديسي سمنز/م). زرعت بذرتين لكل سندانة وبواقع خمسة مكررات لكل معاملة، وبعد **45** يوم من الزراعة تم احتساب نسبة الإنبات وفق المعادلة التالية الموضحة من قبل كل من **Hamidi** و**Safarnejad** (**7**):

نسبة الإنبات = (عدد البذور النابتة / عدد البذور الكلية) **X 100**

التحري عن جين *SKC1* المسؤول عن بعض آليات تحمل الملوحة في الرز

استخلاص الحامض النووي الرايبوزي RNA وصناعة cDNA

طحنت الأوراق الفتية المأخوذة من بادرات أصناف الرز (عمر 45 يوما") بالنتروجين السائل في ظروف مختبرية مبردة، ثم عزل الحامض النووي الرايبوزي الكلي Total RNA منها اعتماداً على الخطوات الموضحة في عدة الاستخلاص المجهزة من قبل شركة Geneaid total RNA purification mini Kit الكورية. ولغرض زيادة نقاوة العينات المستخلصة لذا فقد اضيف انزيم RNase-free DNase-I المصنع من قبل شركة (Biobasic) الكندية، الى العينات لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 37 م°. قُدّر تركيز ونقاوة الـ RNA المستخلص بواسطة جهاز Nanodrop (انكليزي)، واختبرت كفاءة الاستخلاص بترحيل العينات في هلام الاكاروز 1.2% وفقاَ لتقنية الترحيل الكهربائي الافقي وباستخدام صبغة الاثيديوم برومايد 0.5%. بعد التأكد من تركيز ونقاوة RNA المستخلص تم تحويله الى الحامض النووي المتمم cDNA باضافة 200 نانوغرام من total RNA الى البادئ Oligo-(dT)$_{15}$ primer اعتماداً على الطريقة المرافقة مع العدة Reverse ranscription system kit المجهزة من شركة (Bioneer) الكورية، وفق البرنامج التالي المتكون من دورة واحدة فقط تتضمن ثلاث مراحل: المرحلة الاولى (Primer annealing) درجة حرارة 35 م° لمدة 3 دقائق، المرحلة الثانية (cDNA Synthesis) درجة حرارة 60 م° لمدة 30 دقيقة، تليها المرحلة الثالثة (Heat inactivation) درجة حرارة 95 م° لمدة 5 دقائق.

تقنية Qualitative PCR لتهيئة ظروف التفاعل

صمم زوجين من البادئات موضحة في (جدول 1)، احدهما متخصص بجين *SKC1* صمم باستخدام برنامج Primer3 output (http://primer3.ut.ee) اعتمادا" على تسلسلها في موقع الجينات العالمي NCBI (12)، والجين الآخر هو B-actin ، ويعدُّ من الجينات القياسية او Reference gene. أجريت عملية تضخيم cDNA بإضافة البوادئ المذكورة كل على حدة في جهاز البلمرة الحراري Conventional-PCR (شركة Bio-rad الامريكية) وفق البرنامج التالي: دورة واحدة بدرجة حرارة 95م° لمدة 5 دقائق ثم تتبعها 40 دورة يتكون كل منها من المراحل التالية، 95 م° لمدة 1 دقيقة، 60 م° لمدة 45 ثانية ، 72 م° لمدة 1 دقيقة، تم تركت العينات لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 72 م°. بعد انتهاء التفاعل والتضخيم حملت العينات توازياً مع الدليل الحجمي في هلام الاكاروز بتركيز 1.2% وفقاَ لتقنية الترحيل الكهربائي الأفقي وباستخدام صبغة الاثيديوم برومايد بتركيز 0.5%.

جدول 1: يوضح نوع البادئات المستخدمة مع تتابعاتها

اسم الجين	البادئ	التسلسل 5'→3'	حجم الحزمة (bp)	رقم الإنضمام إلى بنك الجينات	المصدر
SKC1	الأمامي	ACGACGACGAGGCTACTGAT	170	DQ148410.1	تم تصميمه في التجربة الحالية
	العكسي	GTCGAGACGACGGTGAAGAT			
β-actin	الأمامي	TGGCACCCGAGGAGCACCCTG	118	AF326781.1	(13)
	العكسي	GCGACGTACATGGCAGGAACA			

تحديد قيمة التعبير الجيني تقنيةٌ باستخدام تقنية Quantitative Real Time-PCR (RT-PCR)

استخدمت تقنية SYBR® Green Dye for quantitative Real Time-PCR للكشف عن جين *SKC1* المرتبط بصفة تحمل الملوحة وتحديد قيمة التعبير الجيني له في الأصناف المحلية للرز، وذلك باستخدام جهاز

Exicycler real time PCR المصنع من قبل شركة **(Bioneer)** الكورية، ولتهيئة ظروف التفاعل الخاص بهذه التقنية فقد استخدمت العدة **premix RT-PCR qPCR kit** المصنعة من قبل شركة **(Bioneer)** الكورية، واضيفت لها بوادئ الجين ***SKC1*** **(target gene)** فضلاً عن بوادئ الجين القياسي **β-actin** المذكورة سابقاً، كلاً على حدة. واتبعت ظروف التفاعل نفسه التي اجريت سابقاً ضمن تقنية **Conventional-PCR** لتحديد قيمة **C_T value**، فضلاً عن اضافة مرحلة اخيرة الى التفاعل تتكون من دورة واحدة بمدى حراري يتراوح بين **60–95** م° لرسم منحنى الانصهار **Melting Curve** لغرض التأكد من عدم وجود ملوثات في التفاعل أو وجود ارتباطات أخرى غير مرغوب بها **Primer dimer**.

رسم المنحنى القياسي لحساب مقدار التعبير الجيني

من ناتج تصنيع الحامض النووي المكمل **cDNA** لاحد النماذج المدروسة من نباتات الرز التي قُدّر تركيزها **600** نانوغرام، فقد اجريت تخافيف عشرية لقطعة **cDNA** وبواقع خمسة تراكيز متسلسلة، و باتباع ظروف التفاعل التي اجريت سابقاً لذا استخدمت تقنية **Real Time-PCR** لتضخيم المادة الوراثية في هذه التخافيف العشرية واحتساب قيم **C_T** من اجل رسم المنحنى القياسي،كما استخدمت البرمجيات على الأنترنيت **http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html** لتحويل تركيز حامض **cDNA** الى لوغارتم عدد النسخ من أجل تقدير قيمتي الميل و**R^2**، فضلاً عن قيمة الكفاءة **efficiency (E)** ومقدار التعبير الجيني **relative expression** وفقاً لطريقة **Livak** و**Schmittgen** (**8**)،حسب المعادلات التالية:

$$E = 10^{-1/slope}$$

$$\text{Relative expression} = E^{[Ct\,(Actin) - Ct\,(SKC1)]}$$

النتائج والمناقشة

تأثير الجهد الملحي في النسبة المئوية للانبات

تشير النتائج المبينة في جدول (**2**) الى وجود اختلاف واضحَ في معدل نسبة الانبات بين المستويين الملحيين المدروسين ، فبلغت نسبة الانبات (**50** %) في المستوى الملحي **15** ديسي سمنز/م مقارنة مع معاملة السيطرة **3** ديسي سمنز/م والبالغة (**85.7**%). كما تبين النتائج وجود فروق واضحة بين الاصناف في نسبة إنبات بذورها، فقد تفوق الصنف مشخاب-**1** على سائر الاصناف واعطى اعلى معدلا" لنسبة الانبات بلغ (**90**%) في حين كان معدل انبات الصنف عنبرالبركة هو الاقل وبلغ (**45**%). كما تبين النتائج وجود تفاوت ملحوظ ومعنوي في حساسية الاصناف أتجاه ارتفاع نسبة الملوحة في التربة، إذ كانت نسبة انبات الصنفين مشخاب-**1** و مشخاب-**2** هي الأعلى في المستوى الملحي **15**ديسي سمنز/م بلغت (**80** و**70**%) على التوالي، في حين كان الصنفين عنبرالبركة وعنبر-**33** من اكثر الاصناف تحسساً أتجاه ارتفاع الملوحة وأعطيا نسبة إنبات بلغتا (**20** و **30**%) على التوالي.

التحري عن جين *SKC1* المسؤول عن بعض اَليات تحمل الملوحة في الرز

إستخلاص الحامض النووي الرايبوزي **RNA** وصناعة **cDNA**

عزل الحامض النووي الرايبوزي **RNA** من الأوراق الفتية لبادرات الرز، وقُدّر تركيزه بـ **200** نانوغرام، في حين بلغت نقاوته من **1.5-1.7** لكل **100** ملغرام من النسيج النباتي، ويوضح شكل (**1**) بعض نماذج ترحيل الحامض **Total RNA** في هلام الاكاروز وتظهر فيه الحزمتين المتميزتين **18S** و**28S** العائدتين للنوع **rRNA**. وبعد التأكد من تركيز ونقاوة حامض **RNA** المعزول تم استخدامه قالباً لتصنيع قطعة الحامض النووي المكمل **cDNA** التي يكون تتابع

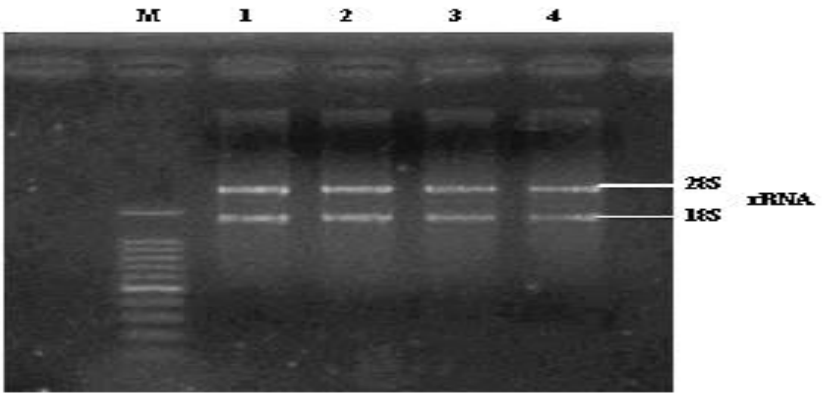
نيوكليوتيداتها مماثلاً لتتابع نيوكليوتيدات الجين الأصلي المكون لذلك الحامض النووي **RNA** وذلك باستخدام البادئ **Oligo (dT)$_{15}$**، المعتمدة على فعالية إنزيم الاستنساخ الرجعي أو العكسي **reverse transcriptase** وهو نوع من أنواع إنزيمات بوليمريز الدنا **DNA polymerase**.

جدول **2**: معدل الانبات (%) لسبعة اصناف محلية من الرز بعد **45** يوماً من الزراعة في مستويين ملحيين مختلفين من كلوريد الصوديوم

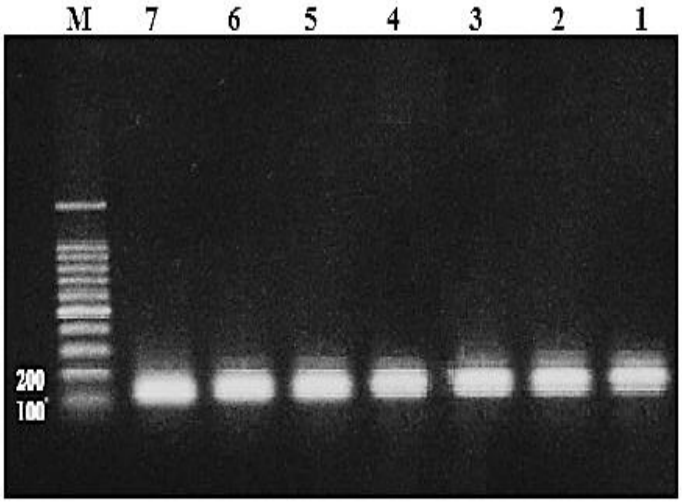
اصناف الرز	المستويات الملحية ديسي سمنز/م		المعدل
	3	15	
عنبرالبركة	70	20	45
عنبر-33	70	30	50
ياسمين	90	40	65
فرات-1	90	60	75
بحوث	80	50	65
مشخاب-1	100	80	90
مشخاب-2	100	70	85
المعدل	85.7	50	
أ.ف.م ≥ 0.05	المعاملات = 1.91	الاصناف= 3.581	التداخل= 5.06

تفاعل البلمرة المتسلسل Qualitative PCR

باستخدام الحامض النووي المصنع **cDNA** فقد تم تضخيم الجين القياسي **β-actin** بواسطة تقنية **Conventional-PCR**، إذ ان الهدفالأساس بهذه الخطوة هو تثبيت الظروف التجريبية المناسبة **Optimization condition** وتقويم كفاءة التفاعل كما يعد جين**β-actin** عنصراً السيطرة **endogenous control** في العينات المدروسة. واظهر الترحيل الكهربائي لهذه الخطوة وجود حزمة رئيسية واضحة في النماذج المدروسة جميعها بحجم (**bp118**)، اعتمادا على الدليل الحجمي المستخدم ذات الوزن الجزيئي **100bp**، (شكل **2**). بعد نجاح عملية تضخيم جين السيطرة **β-actin** استخدمت ظروف التفاعل نفسها لتضخيم الجين الثاني ***SKC1*** المسؤول عن تحمل الاجهاد الملحي، وقد اعطت بادئات الجين ***SKC1*** حزمة واضحة ومميزة *بحجم* (**bp170**) في عينات الرز المدروسة كما يوضحها شكل (**3**) ، اعتمادا على الدليل الحجمي المستخدم ذي الوزن الجزيئي (**bp100**) مما يشير الى تشخيص الجين ***SKC1*** في جميع اصناف الرز المحلية جميعها المستخدمة في الدراسة.



شكل **1**: ترحيل بعض نواتج عزل الحامض الرايبوزي **Total RNA** من الأوراق الفتية في هلام الاكاروز بتركيز **1.2**%.



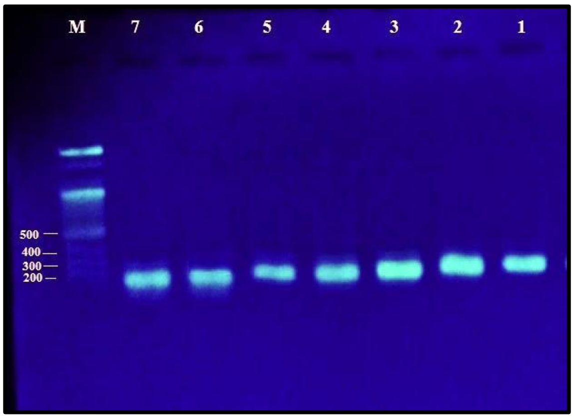
شكل 2: تبين ترحيل بعض نواتج تفاعل **PCR** للجين **β-actin** (**bp118**) في هلام الاكاروز بتركيز **1.2**%.

تقدير قيمة التعبير الجيني لجين ***SKC1*** باستخدام تقنية **(RT- Quantitative Real Time-PCR PCR)**

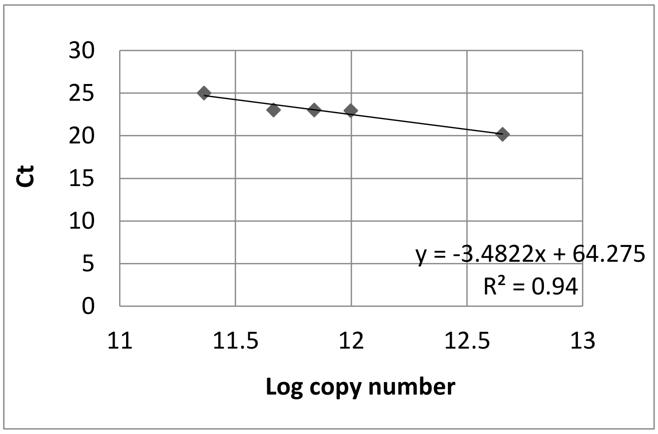
استخدمت تقنية **YBR® Green Real Time-PCR** للكشف عن جين ***SKC1*** ودراسة تعبيره الجيني في أصناف الرز تحت ظروف الشد الملحي، إذ تم تضخيم كل من الجينين ***SKC1*** و ***B-actin*** ودراسة نقطة الانصهار وتحديد قيمة دورة العتبة C_T لهما في اصناف الرز كافة قيد الدراسة. ولإجراء الحسابات الخاصة بتقدير قيمة التعبير الجيني فقد تم احتساب قيمة كفاءة التفاعل **Q-PCR Efficiency** وذلك من خلال تضخيم خمسة تخافيف متسلسلة من **cDNA** بواسطة **real-time PCR** لاحد النماذج المدروسة من نباتات الرز ورسم المنحنى القياسي لها باستخدام قيم C_T ولوغارتم عدد النسخ لتقديرقيمة كفاءة التفاعل **efficiency (E)**، فضلاً عن تقدير قيمتي الميل و R^2، كما في شكل **4**. يوضح جدول (**3**) وشكل (**5**) تضخم ناتج التفاعل للجين القياسي ***B-actin*** *وتحديد قيم* C_T التي تراوحت بين - **87** (**23.23.04**) في النماذج المدروسة جميعها، اما الجين ***SKC1*** فقد سجل قيم C_T تراوحت بين (**22.50** – **35.41**). واظهرت النتائج ان مقدار كفاءة التفاعل كانت **86.892**%، دلالة على إن كفاءة تضخيم الجين***SKC1*** كانت جيدة. وبالاعتماد على كفاءة التفاعل وقيم C_T فقد تم احتساب قيمة التعبير الجيني لنماذج الرز المدروسة.واشارت النتائج الى تشخيص الجين ***SKC1*** في جميع اصناف الرز المستخدمة كافة قيد الدراسة، إلاّ انّ مقدار التعبير الجيني له سجل فروق واضحة ومعنوية بين هذه الاصناف فضلاً عن وجود فروق معنوية في التعبير الجيني بين المعاملة الملحية وبين معاملة السيطرة، كما هو موضح في (جدول **3**). حيث ان كلا الصنفين مشخاب–**1** ومشخاب–**2** سجلا اعلى قيم في مقدار التعبير الجيني لجين ***SKC1*** عند المستوى الملحي **15** ديسي سمنز/م، اذ بلغت هذه القيم (**1.150** و**1.148**) على التتابع. في حين اعطى الصنفين فرات وبحوث قيماً للتعبير الجيني المتوسطة بلغتا (**0.514** و **0.573**) على التوالي في المستوى الملحي، نفسه اما الأصناف الثلاث عنبرالبركة وعنبر–**33** وصنف ياسمين ،فلم تسجل بياناتهم فرقاً معنوياً ملحوظاً مقارنة مع القيم المسجلة في معاملات السيطرة.

جدول 3: يبيّن قيم C_T والتعبير الجيني لجين *SKC1* المسؤول عن بعض آليات تحمل الملوحة في الرز

اصناف الرز	المستويات الملحية ديسي سمنز/م	قيمة C_T للجين *SKC1*	قيمة C_T للجين β-actin	التعبير الجيني* Gene expression= $E^{[Ct\ (SKC1) - Ct\ (B\text{-}actin)]}$
عنبرالبركة	3	32.23	23.04	0.272
	15	31.41	23.76	0.338
عنبر-33	3	30.63	23.42	0.360
	15	31.51	23.21	0.308
ياسمين	3	34.28	23.10	0.205
	15	32.59	23.44	0.273
فرات-1	3	31.08	23.48	0.340
	15	28.19	23.49	0.514
بحوث	3	30.53	23.63	0.376
	15	27.75	23.82	0.573
مشخاب-1	3	31.96	23.33	0.294
	15	22.88	23.87	1.150
مشخاب-2	3	35.41	23.63	0.188
	15	22.50	23.48	1.148
*أ.ف.م ≥ 0.05 بين قيم التعبير الجيني = 0.11				

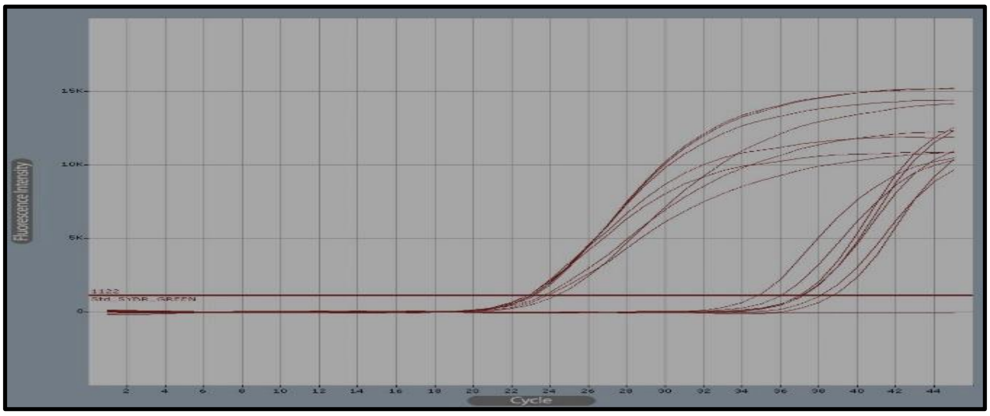


شكل 3: ترحيل نواتج تفاعل Real Time PCR للجين *SKC1* (bp170) في هلام الاكاروز بتركيز 1.2%.



شكل 4:رسم المنحني القياسي توضح معادلة الخط المستقيم معادلة الخط المستقيم

Slopes = -3.6822, Efficiency (E) =86.892%
Reaction efficiencies (R^2) = 0.94



شكل **5**: ناتج تفاعل **Real Time PCR** للجين***SKC1*** والجين القياسي ***B-actin*** في سبعة أصناف محلية من الرز.

وفي دراسة بصدد فهم آليات التعبير الجيني فقد أشار **Al-Mishhadani** (5) الى ان قيمة التعبير الجيني تعتمد على درجة الإجهاد البيئي، فكلما زادت الملوحة زاد التعبير الجيني لان مقدار التعبير لأي جين هو عبارة عن التداخل بين البيئة والوراثة او ما يسمى جين التفاعل البيئي (**Gene Environmental interaction**). وعليه فان التحري عن اي جين مرتبط بصفة تحمل الملوحة يجب إن يكون مصحوباً بتقدير التعبير الجيني له وتحديد المستوى الملحي الذي يحفزه على التعبير.وقد أوضحت الدراسات وجود تباينات واضحة بين اصناف الرز في امتلاكها للعوامل الجينية التي تمكنها من تحمل الشد الملحي، فقد اشار **Zhu** (17) الى وجود ثلاثة جوانب رئيسة على مستوى التعبير الجيني تتحكم بصفة التحمل للإجهاد الملحي هي: التوازن الأيوني، ومراقبة الأضرار وتنظيم النمو، وهذه العوامل يجب أن يسيطر عليها تنظيم ثلاث فئات من الجينات الوظيفية هي النقل والدفاع عن الخلايا وإزالة السموم، والتمثيل الغذائي والطاقة (التمثيل الضوئي). وباستخدام تقنية **cDNA microarray** فقد تمكن **Dai Yin** وجماعته (6) من تشخيص عدد كبير من الجينات الوظيفية التي يعتقد انها تشارك في صفة تحمل الملوحة في الرز.كما اكد **Walia** وجماعته (15) ان العديد من الجينات المسؤولة عن بعض الصفات الفسلجية في الرز يتم تحفيزها تحت ظروف الشد الملحي كتحفيز الجينات المسؤولة عن الانزيمات التي تدخل في مسارات تصنيع الفلافونيدات وتحفيز الجينات المسؤولة عن الجدار الخلوي. وغالباً ما تتعلق صفة تحمل الملوحة في الرز مع قدرة النبات على استبعاد ايون Na^+ من المجموع الخضري والحفاظ على نسبة ايوني Na^+/K^+ في خلايا النبات (10). وتشير الدراسات الى ان ميكانيكية تحمل الملوحة التي يسيطر عليها الجين ***SKC1*** في الرزتتعلق بالحفاظ على مستوى أيون K^+ في خلايا المجموع الخضري، فقد وجد بانه يشفر لناقلات من نوع **HKT** والتي يرتبط عملها بنقل واستبعاد أيون Na^+ (12). اما **Thomson** وجماعته (14) فقد اعطوا توصيفاً واضحاً عن اهم الجينات التي تتحكم بمواقع الصفات الكمية **Quantitative trait loci (QTL)** المسؤولة عن آليات تحمل الملوحة في الرز، منها الجين ***CHL*** المسؤول عن محتوى الكلوروفيل في الاوراق، الجين (***RNK***) المسؤول عن الحفاظ على نسبة ايوني Na^+/K^+ في الجذور، الجين (***SNK***) المسؤول عن *الحفاظ على نسبة أيوني* Na^+/K^+ في المجموع الخضري، الجين (***SKC***) المسؤول عن الحفاظ على تركيز K^+ في المجموع الخضري، وغيرهم من الجينات الاخرى.

الاستنتاجات

من النتائج المذكورة آنفاً يتبين لنا تدرج اصناف الرز السبعة في قابليتها على تحمل الملوحة، إذ تفوق الصنفين مشخاب-**1** ومشخاب-**2** على سائر الاصناف في اعطائهم اعلى معدلاً في نسب انبات بذورهم تحت ظروف الشد الملحي، فضلاً عن ان قيم تعبير الجين ***SKC1*** كانت الاعلى مقارنة بسائر الاصناف المدروسة، لذا يعدُ هذان الصنفان

متحملان للملوحة. اما الصنفان فرات- 1 وبحوث فيمكن عدهما من الاصناف المتحملة نسبياً للملوحة او شبه المتحملة، وذلك لان قيم التعبير للجين *SKC1* المرتبط بتحمل الملوحة كانت مرتفعة نسبيا مقارنة مع معاملة السيطرة، فضلاً عن ان معدل انبات البذور كان متوسطا في معاملة الشد الملحي. اما الاصناف التي اكدت التجربة حساسيتها للملوحة مهم عنبر البركة وعنبر-33 وياسمين، اذ ان مقدار تعبير الجين *SKC1* المتحمل للملوحة لم يعط اختلافاً معنويا او تعبيراً محسوساً بعد تعرضه للشد الملحي فضلاً عن ان تجربة الانبات اكدت هذه الحساسية وذلك بتسجيلهم اقل القيم في معدلات نسب انبات البذور. وعليه يمكننا ان نستنتج وجود نسبة عالية من التباين الوظيفي بين العينات المدروسة فيما يخص قابليتها على تحمل الاجهاد الملحي وهذا ما يقود الى وجود تباين وراثي وظيفي مهم فيما بين هذه الاصناف. وعلى الرغم من ان التجارب الحقلية توفر معلومة مهمة حول مدى التباين الوراثي فيما بين الاصناف في قابلية تحملهم للإجهاد البيئي الا ان التقانات الحديثة على مستوى الدراسات الجزيئية توفر معلومات دقيقة ومستفيضة بخصوص اهم الميكانيكيات التي تتبعها الاصناف النباتية لحماية نفسها من الشدود البيئية ولاسيما الاجهاد الملحي، لذا يعتبر عزل ودراسة هذه الجينات أمراً كبيراً لتحسين الزراعة العالمية وأملاً مستقبلياً لنقل بعض المواقع الجينية إلى الاصناف الحساسة.

المصادر

1-الساهوكي، مدحت مجيد و مصطفى جمال الخفاجي (2014). آلية تحمل النبات لشد الملوحة، مجلة العلوم الزراعية العراقية، 45(5)، 430-438.

2-الكعبي، حسين خلف ؛ عباس مهدي جاسم ومريم جاسم محمد (2010). التحمل الملحي لصنفين من الرز *Oryza sativa* L. خارج الجسم الحي، مجلة ابحاث البصرة، 36(3)، 25-38.

3-محمد، لبيد شريف (2010). آلية تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية من الرز *Oryza sativa* L.، مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 10(2)، 23-32.

4-Ahmad, M. (2011). Evaluation of Wheat Genotypes for Salt Tolerance Based on conventional and molecular approaches, Ph.D. Thesis, Arid Agriculture Univ. Rawalpindi, Pakistan.

5-Al-Mishhadani, I. I. H. (2012). Breeding and selection of some lines of bread wheat for salt tolerance. Journal of Agricultural Science and Tech. B2, 934-939, DOI:10.17265/2161-6264/2012.08B.007.

6-Dai Yin, C. H. A. O.; Y. H. Luo; S. H. I. Min; L.U.O. Da; and H.X. LIN (2005). Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis, Cell Res., 15(10), 796-810.

7-Hamidi, H.; A. Safarnejad (2010). Effect of drought stress on alfalfa cultivars *Medicago sativa* L. in germination stage, American-Eurasian J. of Agric. and Environmental Sci., 8(6): 705-709.

8-Livak, K. and T. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. Methods, 25, 402-408.

9-Mass, I. V.; G. J. Hoffman (1977). Crop salt tolerance current assessment, J. of the Irrigation and Drainage Division, 103(2), 115-134.

10-Martínez-Atienza, J.; X. Jiang; B. Garciadeblas; I. Mendoza; J.K. Zhu; J.M. Pardo and F.J. Quintero (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice Plant Physiology, 143(2), 1001-1012.

11-Parto, R. and F. Timothy (2009). The ionic effect of NaCl on physiology and gene expression in rice genotypes differing in salt tolerance, Plant and Soil, 315(1-2), 136-147.

12-Ren, Z .H.; J. P. Gao; L. G. Li; X.L. Cai; W. Huang; D.Y. Chao; M.Z. Zhu; Z.Y. Wang; S. Luan and H.X. Lin (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. Nature Genetics, 37(10), 1141-1146.

13-Schachtman, D. and W. Liu (1999). Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants, Trends in Plant Sci., 4(7), 281-287.

14-Thomson, M. J.; M. de Ocampo; J. Egdane; M.A. Rahman; A.G. Sajise; D.L. Adorada; E. Tumimbang-Raiz; E. Blumwald; Z.I. Seraj; R.K. Singh; G.B. Gregorio and A.M. Ismail (2010). Characterizing the Saltol quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. Rice, 3(2), 148-160.

15-Walia, H.; C. Wilson; P. Condamine; X. Liu; A.M. Ismail; L. Zeng; S.I. Wanamaker; J. Mandal; J. Xu; X. Cui and T.J. Close (2005). Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. Plant physiology, 139(2), 822-835.

16-Zhou, W.; Y. Li; B. C. Zhao; R.C. Ge; Y. Z. Shen; G. Wang and Z.J. Huang (2009). Overexpression of *TaSTRG* gene improves salt and drought tolerance in rice, J. of Plant Physiology, 166(15), 1660-1671.

17-Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Bio., 53, 247-73.

MOLECULAR DETECTION OF *SKC1* GENE RESPONSIBLE FOR SALINITY TOLERANCE AND STUDYING ITS GENE EXPRESSION IN THE GERMINATION OF SOME LOCAL VARIETIES OF RICE *Oryza sativa L.*

E. N. Ismail **A. S. Abed**
D. M. Majeed **A. M. J. Al-Jibouri**

ABSTRACT

Rice is considered as a sensitive crop to salt stress, particularly in seed germination stage and varieties tolerance difference based on their genetic characteristics or genetic content. The current study aimed to investigate one of the important genes responsible for rice tolerance under salinity stress condition (*SKC1*) in seven local varieties of rice: Amber Al-Baraka, Amber-33, Yasmin, Furat-1, Bouhoth, Mushkhab-1 and Mushkhab-2. RNA was extracted from the leaves of these varieties at 45 days after they were grown at the salted level (15 dS/m), as well as the control treatment (3 dS/m), and the study of their gene expression subjected using the molecular technique SYBR Real time PCR. The results showed that the two cultivars, Mushkhab-1 and Mushkhab-2, were reveal *SKC1* gene high expression, which is associated with salinity tolerance when compared with other studied cultivars. While the two cultivars, Furat-1 and Bouhoth were considered relatively salt-tolerant or semi-tolerant, because the *SKC1* gene expressions to them were relatively high compared with the control treatment. The varieties that the experiment confirmed its sensitivity to salinity are Amber Al-Baraka, Amber-33, and Yasmin, since the amount of gene expression did not appear any significant difference or expression after exposure to salt tolerance compared with the control treatment.

Biotechnology Res. Center,Al-Nahrain Univ., Baghdad, Iraq.