تربية النبات بمساعدة المعلمات الجزيئية

مدحت الساهوكي

قسم علوم المحاصيل / كلية الزراعة / جامعة بغداد

المستخلص

على الرغم من إطلاق آلاف الأصناف والسلالات من مختلف الأجناس والأنواع النباتية في العالم بأعداد طرائق تربية النبات التقليدية ، إلا أنها استغرقت عدة سنوات لاستنباطها . لقد ظهر علم جديد يرتبط بتربية النبات وهو الوراثة الجزيئية . إن استخدام طرائق هذا العلم مع الطرائق التقليدية لتربية النبات سوف يختصر سنين البرنامج الى درجة كبيرة مما يجعل في تشخيص أدق وأسرع بكثير من السابق. لقد وجد انه لإنتاج صنف تكراري بالتضريب الرجعي يحتاج الى أكثر من عشرين موسماً لنقل كامل الجينات المسؤولة عن حاصله، كما ان الموقع الجيني الواحد قد يحمل 2-16 أليلات مختلفاً، مما يجعل تشخيص مثل هذه المواقع أمراً صعباً إذا استخدمت طرائق التربية التقليدية لوحدها. هذا ونظراً لشيوع طرائق عديدة لتشخيص جينومات النباتات المختلفة بأعداد المعلمات الجزيئية ، ولأجل إعطاء القارئ فكرة موجزة عن هذه الطرائق فقد تم ذكر بعضها على أمل امكانية استخدامها مستقبلاً لدى وفرة مستلزماتها. تضمنت تلك الطرائق

RFLP= Restricted Fragment Length Polymorphism و AFLP= Amplified Fragment Length Polymorphism و RAPD = Randomly Amplified Polymorphic DNA و SNP= وطرائق أخرى حديثة مثل Single Nucleotide Polymorphism.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 37(4) : 67 - 72, 2006

Elsahookie

MOLECULAR MARKERS ASSISTED PLANT BREEDING

Medhat M. Elsahookie

Dept. of Field Crop Sci. /Coll. of Agric. /Univ. of Baghdad

ABSTRACT

Despite the release of thousands of different crop cultivars in the world via conventional breeding methods. These methods are still considered so lengthy, and time consuming when compared to molecular markers assisted plant breeding. The use of molecular markers will facilitate and enhance the efficiency of conventional plant breeding methods. It was found that to transfer all genes controlling yield of a recurrent cultivar we need about twenty generations of backcrossing. However, it was found that each locus in a group of maize inbreds involved 2-16 different alleles. That makes conventional breeding methods alone less efficient to fulfill all required yield loci. Meanwhile, several techniques of molecular markers were developed and used all over the world. The most prominent techniques of those were; RFLP= Restricted Fragment Length Polymorphism, AFLP= Amplified Fragment Length Polymorphism, RAPD= Randomly Amplified Polymorphic DNA, and other techniques, especially the newest one; SNP= Single Nucleotide Polymorphism.

المقدمة

ظهرت طريقة PCR=Polymerase Chain Reaction عام 1990 ، وتعددت الطرائق بعدها بتعدد الباحثين وتعدد أفكارهم في استخلاص أكبر قدر من DNA النبات ثم عزله بالطرد المركزي وأختباره بأحدى هذه الطرائق المرتبطة بوفرة عدد من المسابير (probes) الضرورية لاعتماد المقارنة والتشخيص (9).

استند جزء كبير جداً من المعلومات الوراثية وطرائق التربية على قوانين (مندل) التي وضعها عام 1866 والاضافات التي وضعت بعد ذلك للتأريخ ، فيما يمكن القول ان بعض طرائق التربية مثل الانتخاب قد مارسها الإنسان الأول منذ فجر الحضارات الأولى في الأستيطان، أي منذ ما يقارب عشرة آلاف سنة ، أو أكثر. بناء على ذلك فإن معرفة الإنسان بالعوامل الوراثية المتكئة بالصفات ساعدته في نقل ودمج العديد من أزواج الجينات المسؤولة عن

تربية النبات هو علم وفن تغيير التركيب الوراثي للنبات بحسب هدف المربي. لقد تطافرت جهود مئات الباحثين في العالم لتطوير أصناف من عدة محاصيل تتعلق بحياة واقتصاديات الإنسان. كان ذلك باتباع طرائق التربية التقليدية المختلفة التي كانت ولا زالت تلعب الدور الأكبر لتطوير أصناف ذات صفات أفضل في الإنتاجية والتنوعية . يشير Ahlowalia وآخرون (1) الى ان عدد الأصناف المحسنة التي أطلقت وانتشرت في العالم خلال السبعين سنة الماضية تجاوز 2250 صنفاً من مختلف المحاصيل .

لقد ظهرت ومنذ أكثر من ربع قرن وتحديداً في عام 1980 طرائق جديدة لتشخيص التوليفة الجينية لنباتات المحاصيل. كانت أولى تلك الطرائق هي RFLP= Restricted Fragment Length Polymorphism التي بدأت في الثمانينيات ، ثم

*تاريخ استلام البحث 2005/9/10 ، تاريخ قبول البحث 2006/4/16

Loc (13 ، 16) ، وهي التحدي الأول امام مربّي النبات لتطوير أصناف محسنة أو هجن عالية الحاصل والصفات النوعية الأخرى. من أجل ذلك ، عمل الباحثون على تطوير علم البايولوجيا الجزيئية الذي بدأ يتطور بسرعة مذهلة مختلفة باختلاف أفكار الباحثين وحجم ونوع التقانات المتوفرة لهم .

كان هدف هذا المقال استعراض بعض الطرائق المستخدمة في الوراثة الجزيئية وفائدتها لمربي النبات عامة ومربي المحاصيل الحقلية خاصة كي تكون بداية لفهم وتطبيق مثل هذه التقانات في العراق لدى وفرة مستلزماتها مستقبلاً، سيما مع ازدياد تطور هذه الطرائق وتخصص عدة مجالات علمية بنشر نتائجها .

المناقشة

1. نبذة تاريخية عن أنظمة المعلمات الوراثية (markers system)

كلما تقدم علم تربية النبات أكثر ، كلما تم ابتكار طرائق أفضل لتشخيص وغربلة المواد الوراثية. لقد كان أول المعلمات الوراثية استخداماً في تربية النبات هي الطفرة ، مثل قصر ارتفاع النبات أو المقاومة لمرض معين أو لون الزهرة . . . الخ . ان استخدام الصفات المظهرية في تربية النبات لم يكن واسعاً ، وذلك لأنه لا يمكن الحكم على التركيب الوراثي من مظهر الأفراد فقط عندما تكون الصفة محكومة بعدة أزواج من الجينات. لقد كان أول استخدام للمعلمات الجيدة هو بالأعتماد على تركيب البروتينات (isozymes) وذلك في عام 1959 ، ولما كان عام 1980 تم تشخيص خرائط التلائم الوراثية (genetic linkages) مثل جين مقاومة الديدان الثعبانية (Aps) باعتماد (isozyme allele) في الطماطم والذي فتح الطريق لأول مرة لاستغلال هذه الظاهرة عام 1980. ان اهم خاصية لاستخدام (isozymes) هي امكانية التمييز بين homozygous و heterozygous لنفس نباتات المحصول. كانت أولى الطرائق البسيطة الفعالة في تشخيص جينوم النبات هي طريقة (RFLP) التي بدأ العمل بها أولاً (6 ، 7 ، 8 ، 9) . تكمن سهولة استخدام هذه الطريقة في كونها تعتمد قطعة DNA قصيرة بحدود الف زوج من النيوكليوتايدات ذات مقدرة على تشخيص بليون أو أكثر من النيوكليوتايدات المرتبطة على الكروموسوم (2 ، 3) . بعد بضع سنين وتحديداً في عام 1990 نشرت طريقة أخرى هي (PCR) (17). تم استنباط طرائق اخرى من هذه الطريقة وذات كفاءة أعلى في تشخيص طبيعة DNA ، مثال:

Randomly Amplified Polymorphic DNA

الإنتاجية والنوعية ومقاومة الأوبئة وظروف الشد البيئي وغير ذلك. لقد أتبع طرائق تربية (تعد طويلة الأمد) لتطوير أصناف المحاصيل مثل الحنطة والشعير والقطن والصويا وغيرها. كان ذلك يتم من خلال انتخاب وتكوين الأباء من جيل لآخر أو تضريبها مع بعضها إما لإنتاج ذريات بتوليفات جينية جديدة أو لتطوير هجن لتلك المحاصيل . لقد استغرقت وتستغرق تلك الطرائق ما بين 10 الى 20 عاماً لإنتاج صنف متميز بصفة أو أكثر. لقد استغرقت عملية تطوير أحد أصناف فول الصويا في العراق 18 عاماً من بدء عملية الانتخاب والتكوين وحتى اعتماد الصنف واكثار بذوره لتوزيعها على المزارعين (4).

تعتمد طرائق التربية التقليدية التعامل مع كامل الجينوم للنبات فيما تعتمد طرائق التربية الحديثة المرتبطة بالوراثة الجزيئية على بعض الجينات أو قطعة DNA موجودة على كروموسوم معين. ان اكتشاف العقم الذكري السايوبلازمي وتطور الزراعة النسيجية للمتوك وحبوب القمح والأجنحة ، واجراء التهجين بين الخلايا وغيرها قد يساعد في تطوير طرائق التربية التقليدية إلا أنها لازالت بطيئة وتحتاج الى عدد من السنين أو المواسم، فضلاً عن كونها غير دقيقة في تشخيص التعبير الجيني والتكرار الجيني. يورد لنا مثلاً Murray وآخرون (15) مثلاً يقول فيه، ان نقل كامل ازواج الجينات المسؤولة عن الحاصل الجيد في الصنف التكراري المنقولة له صفة جديدة من صنف واهب يعطي فقط 90% من الجينوم بعد الجيل العاشر للتضريب الرجعي (BC₁₀) ، فيما يحتاج البرنامج الى (BC₂₀) لاستعادة صفات كامل الجينوم. ان هذه الحالة لم تكن معلومة سابقاً في طرائق التربية التقليدية، فضلاً عن ظهور جينات غير مرغوب فيها للصنف التكراري، الأمر الذي يستوجب زراعة مجتمع كبير من الصنف التكراري لعدة مواسم في عدة مواقع واجراء التنقية للصنف مما يتطلب أجيالاً اضافية. كذلك فإن نقل صفة منتخبة بالتضريب الرجعي تستلزم من المربي اعتماد حلقة اضافية من التلقيح الذاتي بعد كل تضريب رجعي، للحصول عليها نقية، وهذا كذلك أطالة لمدة عمل برنامج التربية .

أما لو أخذنا الصفات الكمية (المحكومة بعدة أزواج من الجينات) والمطلوب نقلها الى الصنف التكراري ، فإن ذلك يتطلب عملاً أصعب بكثير من نقل صفة محكومة بزواج أو زوجين من الجينات . مثال ذلك ، نقل صفة تحمل الجفاف أو الملوحة أو الحرارة العالية أو القدرة على منافسة الأدغال وتحمل العناصر السامة، وغيرها. ان مثل هذه الصفات محكومة بمجموعة من ازواج الجينات يطلق عليها مواقع الصفة الكمية QTL = Quantitative Trait

أخرى. استناداً لذلك ، فقد تم تشخيص أعداد كبيرة من المعلمات الوراثية واستخدمت لتشخيص جينوم الكائنات الحية. قد تكون الصفة الموروثة ناتجة من فعل أب واحد متغلب أو من فعل الأبوين معاً (حالة التغلب الجزئي) ، أو تكون الصفة محكومة بجينات النواة من أب وجينات السايٲوبلازم من الأم. كذلك يعتمد انتقال الصفة على عدد المواقع الجينية ذات العلاقة بالصفة وعدد الأليلات على الموقع الواحد بحسب الحالة diploid أو ploidy للنبات. أما عن الفعل الجيني فقد يكون متغلباً أو متغلباً جزئياً أو متفوقاً (epistasis) أو فوق التغلب (overdominance) أو تغلباً مشتركاً (codominance) أو تفوقاً مشتركاً (coepistasis) بفعل تكميلي أو بفعل جين مضيف. أن س يظهر الجين المعلم (marker gene) بحسب علاقته مع التغلب المشترك في حالة وجود قوة الهجين . كذلك قد تظهر في بعض الحالات أفراد متماتة الصفة مع كون جيناتها مختلفة (polymorphic) والتي يعتقد انها ذات علاقة بظهور قوة الهجين ، فتكون الجينات في أفراد الهجين بحالة (hemizygous) بدلا من (heterozygous) مثل (A₁A₂) أو (B₂B₃) ، وغير ذلك . إن ذلك سيجعل مادة DNA مختلفة لدى مقارنة مادتها الوراثية بظهور (bands) مختلفة اللون والمساحة بحسب اختلاف طبيعة التركيب الوراثي لذلك النبات (12).

3. استخدام (isozymes) ومعلمات DNA

لقد شاع منذ عدة سنوات استخدام (isozymes) لتشخيص المادة الوراثية في النباتات . ان (isozymes) هي مركبات بروتينية يمكن تشخيصها بسهولة باستخدام الترحيل الكهربائي (electrophoresis) التي يتحدد بها (enzyme) ذلك التركيب الوراثي بحسب فعل الجين فيه (2). ان جزيئات الأنزيم هي ناتج مباشر لفعل الجين الحاكم لتلك الصفة وكذلك لطبيعة فعل DNA فيه والذي يلعب الدور الفعال في نقل الصفة من خلال سيطرته على مجمل الأنشطة الكيموحيوية في النبات. من المعلوم ان الأنزيمات هي سلاسل من الأحماض الأمينية تحدها طبيعة DNA ذلك الكائن وبحسب سلاسل النيوكليوتيدات فيه . اذا تماثلت تلك الأنزيمات في سلاسل النيوكليوتيدات فتسمى (isozymes) ، واذا اختلفت سميت (allozymes). استناداً لذلك فإن طريقة الترحيل الكهربائي سوف تعطينا قراءات متباينة عن التركيب الوراثية المدروسة بحسب اختلاف حجم وعدد الأشرطة (bands) التي تظهر بالفحص على المادة الوراثية . ان هذا هو ما يسمى (allozymic polymorphism) والذي يعد من بين الطرائق الفعالة التي أحدثت ثورة معلوماتية في كيمياء وراثية المجتمعات النباتية والتطور الذي حدث فيها ، وبذا فقد

و Sequence Characterized= SCAR
Amplified Regions
Amplified Polymorphism = AFLP
Fragment Length
والتي استخدمت وتستخدم في برامج تحسين عدة محاصيل في العالم. ان من بين هذه المعلمات الوراثية ما هو بسيط في تركيبه الجزيئي، مما يجعل استخدامها في تربية النبات سهلاً ومفيداً وسريعاً في تشخيص جينات الصفة الكمية على الكروموسومات. ان استخدام تلك المعلمات الوراثية نقلت علم تربية النبات من واقع الى واقع آخر سمي (Plant Molecular Breeding). لأجل فهم ذلك ، لابد من ايضاح بعض التعابير والطرائق المستخدمة في هذا المجال .

2. ماهية المعلمات الوراثية (genetic markers)

اذا حددنا صفة كمية لنبات محصول ما من بين مجموعة من الصفات الأخرى ، فإن هذه الصفة المحددة يمكن لأي نبات من نباتات ذلك المحصول ان يمتلكها ، وتشخص على انها صفة مظهرية (phenotypic) ، وان الجينات المسؤولة عنها تكون هي العوامل الوراثية (genotypic) في جينوم ذلك النبات. إن تلك الصفة ستكون محكومة بعدد من أزواج الجينات الواقعة على مواقع (loci) محددة على الكروموسوم . تضم مثل هذه المواقع بطبيعتها نوعين من الجينات، مشفرة (coding) وغير مشفرة (non-coding) و كذلك المسماة بالجينات الساكنة (silent genes) . قد يظهر فعل الجينات الأخيرة لدى زراعة الصنف في بيئة أخرى من غير البيئة التي استنبط الصنف فيها وذلك من خلال عملية التداخل الوراثي × البيئي. إن ذلك النوع من التأثير الوراثي يسمى (epigenetic) وهو ناتج من تداخل فعل جينات غير مشفرة مع بعض عوامل تلك البيئة (5). لدى استخدام المعلمات الوراثية ، فإن اصطلاح جين قد يطلق على قطعة (segment) من DNA ذلك النبات طالما يعتقد من نتيجة التحليل الجزيئي ان تلك القطعة هي التي تحمل مورثات الصفة وليس بالضرورة الجين المسؤول وحده (functional gene) . لقد أوضح Gillet (11) ان الموقع الجيني (locus) هو (set) من الجينات المتماثلة تقع على نفس النقطة من الكروموسوم. ان ذلك يوحي انه يمكن ان توجد عدة جينات (اليلات) متباينة التركيب لكنها متماتة في الفعل على الصفة فهي من نوع (polymorphic).

يمكن تأكيد العلاقة بين الشكل المظهري والتركيب الوراثي من خلال التحليل الجزيئي للصفة، فأذا انتقلت من الآباء الى الأبناء وحددت نعر الاتها فيمكن القول عن تلك الصفة انها معلمة وراثية (genetic marker) يمكن ان تستخدم لدراسة صفات

الطفرات في تلك الأفراد. يتم التعويض بنوكليتيدات مفردة مكان موقع معين على DNA ، وبها يمكن معرفة تأثير ذلك الموقع في صفات الفرد. كذلك يمكن بهذه الطريقة تحديد مقدار الحذف أو الأضافة الجزيئية أو الإدخال أو النقل أو التكرار الذي حدث في مادة DNA للكائن. تستخدم منظومة من الأنزيمات لها المقترنة على أظهار عدة أليلات لكل أنزيم مما يكون لنا صورة تسمى (fingerprinting) يتميز بها DNA كل فرد عن الآخر . أما موجز استخدام هذه الطريقة فيتضمن استخلاص DNA النبات بعد تقطيع أجزائه ووضعها في الماء داخل خلاط كهربائي ثم ينقل المحلول الناتج الى انابيب الطرد المركزي ثم يهضم DNA باستخدام أنزيمات التحديد التي نكرناها ثم يوضع على هلام (gel) ويرحل كهربائياً ويتم جمع DNA المكون الذي يكون لنا بلازميدة (plasmid) ثم تعلم هذه البلازميدة بالفسفور المشع (P^{32}). يؤخذ مسبار (probe) معروف التركيب الجزيئي ومعلم بالمادة المشعة أو الملونة ثم يهجن على ناتج الترحيل الكهربائي المنقول على غشاء. تعرض بعد ذلك الورقة على أشعة اكس للحصول على صورة شعاعية ذات حزم مختلفة يمكن تمييزها بسهولة . ان هذه الأشرطة هي التي توضح درجة تماثل المسبار المستخدم مع البلازميدة (DNA المجزأ) فتحدد بذلك نيوكليتيدات تلك القطع قيد الاختبار . إن هذه الطريقة لازالت مقيدة الاستخدام لحاجتها الى المواد المشعة التي لا تتوفر في العديد من المختبرات في العالم .

AFLP

تمثل AFLP قطعاً من DNA مفخمة (amplified) بواسطة برايمرات (primers) خاصة بالهضم التحديدي (restriction digestion) لجينوم DNA النبات وبالاعتماد على اختلاف ترتيب النيوكليتيدات (14). يعطي هذا التكتيك البصمة الوراثية (fingerprint) لأي DNA لأي مصدر دوتما حاجة الى أية معرفة مسبقة عنه. أما قراءة البيانات بهذه الطريقة فهي بسيطة، حيث تعتمد على مبدأ وجود أو عدم وجود مواقع الجينات بدلاً من تحديد موقعها أو طولها. تتضمن الطريقة الأستعانة باختبار (PCR) لتفخيم القطع المحددة من DNA عن طريق هضم DNA باستخدام أنزيمات التحديد ، وربط (adapters) على قطع DNA ، ثم تفخيم تلك القطع باستخدام الأنزيمات . يمكن تفخيم معدل 75-150 قطعة (fragment) لكل توليفة primer مستخدمه في الاختبار ، وبذا يتم الحصول على معلومات واسعة جداً بحسب تعدد البرايمرات المستخدمة. تمثل كل قطعة تم تشخيصها بهذه الطريقة موقعاً جينياً مميزاً عن غيره . إن أهم فائدة لطريقة AFLP هي إنتاج أكبر عدد من

استخدم تلك كمعلمة وراثية . لقد وجد Farook و Sayyed (7) ان بعض انزيمات القطن قد تغيرت لما زرع نفس التركيب الوراثي في بيئات مختلفة، وهذا يشير الى فعل التداخل الوراثي البيئي.

4. كيفية اختيار المعلم الوراثي المناسب

استخدمت ولا زالت تستخدم عدة معلمات وراثية بما في ذلك (isozymes)، وذلك لكونها غير مكلفة، وأنها تعطي صورة جيدة ذات اساس علمي ثابت تقريباً لأرتباطها بطبيعة البروتينات. مع ذلك فلأن اختيار المعلم الوراثي يعتمد احياناً على هدف المربي، فلو اريد مثلاً التمييز بين اثنين من الأصناف المنحدرة من أصل واحد فأن المعلمات الجزيئية RAPD و RFLP و AFLP تكون هي الأنسب (6)، فيما تكون المعلمات (isozymes) هي الأنسب لدى الرغبة في تشخيص فعل الشد البيئي على التركيب الوراثي. من جهة أخرى ، فأن طرائق (DNA-micro array) تعد عالية الثمن وتحتاج الى مهارة عالية لاستخدامها . هذا وان معلمات (isozymes) قد فشلت مثلاً في تشخيص الرز بسمتي 370 لدى مقارنته مع اثنين من الطوافر القصيرة الارتفاع المشتقة منه وذلك بسبب انخفاض مستوى polymorphism بينها ، غير ان استخدام RAPD كان فعالاً في تشخيصها (8).

5. محاسن وعيوب معلمات DNA

هنالك اربع من المعلمات الجزيئية شائعة الاستخدام في تشخيص المادة الوراثية للنبات هي RFLP و AFLP و RAPD و Single=SSR Sequence Repeats فضلاً عن معلمتين أخريين هما (Internal Transcribed Spacer=ITS) و (Complementary DNA=cDNA) (9). إن المعلومات الوراثية للكائن الحي موجودة في كروموسومات النواة والسايوتوبلازم والتي تكون مادة DNA لجينوم ذلك الكائن. تختلف المادة الوراثية لنفس الكائن باختلاف الطفرة أو الحذف أو الأنتقال ، وغير ذلك (9). يستخدم للتمييز بين هذه الحالات ما يسمى بأنزيمات التحديد (restriction enzymes) التي لها المقدر على تشخيص ترتيب (تتابع) (sequence) معين في DNA ذلك الكائن، وتسمى (restriction sites) ، وبذا لا بد من استخدام الهضم لاخترال DNA الى قطع (fragments) صغيرة تحدد باستخدام تلك الأنزيمات والتي تكون لنا باستخدامها مايسمى (RFLP) (9).

RFLP

تعد هذه الطريقة الأولى والتي ظهرت عام 1980 (3)، وهي أول معلمة جزيئية ناتجة من فعل الفروق بين ترتيب النيوكليتيدات في النبات التي تعطي تغايرات في أطوال القطع الجزيئية الناتجة من فعل

معلمات جزيئية أخرى

إن من بين هذه المعلمات ما يسمى SCAR والتي هي اختصار لتعبير Sequenced Characterized Amplified Regions . يعتمد هذا التكنيك كذلك على PCR المستند الى طريقة تقطيع DNA . هنالك أيضاً طريقة STS = Sequenced Tagged Sites وهو تكنيك عام يشتمل على كافة التكنيكات الأخرى التي تعتمد معدل 1824 bp فأكثر (9) ، والتي يمكن الحصول عليها من بروتات RFLP . كذلك يستخدم تكنيك Single=SPLAT Polymorphic Amplification Test الذي يستخدم في حالة فشل (STS) في الكشف عن polymorphism الموجود في DNA ذلك الكائن . يعد تكنيك SPLAT بشكل عام من المعلمات التي تعمل على شكل (on) أو (off) لتشخيص وجود أو عدم وجود تقطيع معين في DNA ذلك النبات. هنالك أيضاً المعلمة الجزيئية Variable Number Tendon Repeat=VNTR وهو يعمل على أساس كشف قطع DNA الربطية المختلفة العدد في جينوم النبات، علماً ان هذه الطريقة أول ما ابتكرت استخدمت لتشخيص جينوم الحيوانات الشبيهة لكنها أعطت علامات جيدة في صلاحيتها للعمل على جينوم النبات. تعتمد كفاءة هذه الطريقة على العدد المتمايز لقطع DNA المتكررة ترتيباً (tandemly repeated) وذلك بالاستعانة ببرامير PCR والترحيل الكهربائي على الهلام. يوجد كذلك تكنيك Single Nucleotide Polymorphism=SNP والذي يعد الأحدث في علم البايولوجيا الجزيئية. يعتمد عمل هذا التكنيك على تغير قاعدة نايتروجينية واحدة في DNA النبات المراد تشخيصه . لقد أصبحت هذه الطريقة شائعة الاستخدام في هذا المجال والتي تعتمد استخدام خيط واحد من DNA موضوع على سطح مادة صلبة مثل قطع السليكون .

الاستنتاج

بعد عشرات السنين من العمل الدؤوب في مجال تربية وتحسين النبات بالطرائق التقليدية، واعتماد الوراثة المنديلية واللامندلية في تحديد عدد أزواج الجينات الحاكمة للصفات المختلفة والطريقة المناسبة لتربية ذلك المحصول للهدف المطلوب، أصبح هذا العلم اليوم يستعين بعدة معلمات جزيئية لتشخيص الأليلات على المواقع الجينية في جينوم النبات. لقد حظيت هذه المعلمات الجزيئية بحقل واسع من الاستخدام لأبحاث عديدة في الفسلجة والتشريح وعلم الأجنة وحلقات التطور وهندسة النبات الوراثية فضلاً عن تربية النبات. إن وفرة عدد كاف من البرامير والبروتات في أي مختبر للتحليل الجزيئي يعد أساساً

الأشكال المتغايرة (polymorphism) . يحتاج الباحث بشكل عام معرفة طبيعة تغيرات DNA الفرد قيد الدراسة ، إلا أنه لا توجد لحد الآن طريقة واحدة تفي بالغرض ، لذا يمكن القول ان كل طريقة من هذه الطرائق لها محاسن وعيوب .

STR

إنها اختصار لتعبير التكرارات المتسلسلة القصيرة (Short Tandem Repeats) من قطع DNA ، وتعد المعلمة الجزيئية المثالية للتنبؤ بالفروق بين أنواع الجنس واصناف النوع الواحد من حيث المادة الوراثية . تتكون هذه المعلمة من 2-7 أزواج قاعدية (base pairs=bp) معادة الترتيب ، وهي قابلة للتوارث وذات مقدرة على تشخيص الجين وأثبتت الأبوته للتركيب الوراثي. تحتاج هذه الطريقة كذلك استخدام PCR كما هو الحال مع طريقة AFLP . تمتلك هذه المعلمة المقدرة على تشخيص جينات النسوة والمائتوكونديريا والكلوروبلاست . تسمى هذه الطريقة كذلك (micro-satellites) . تعمل STR النووية على تشخيص جينات كلا الأبوين (biparental) للفرد ، حيث تمتلك مواقع ذات عدة اليلات لكل موقع ، فيما تعمل STR الكلوروبلاست والمسماة (cp) بمقدرة تشخيص أحادية الأبوته (uni-parental) ، وهي كذلك ذات عدة اليلات لكل موقع جيني لكنها ضعيفة في تشخيص أفراد مجتمع واحد بالمقارنة مع مقدرتها في تشخيص أفراد عدة مجتمعات نباتية (9) .

cDNA

إن حالة تطبع أفراد صنف معين لبيئة معينة غير مفهومة على وجه الدقة لحد اليوم ، إلا أنه من المعتقد ان هناك جينات من نوع (silent genes) قد تعمل في بيئة ولا تعمل في أخرى ، فتظهر بذلك فروق الأداء للأصناف عبر البيئات . إن الطرائق التي ذكرناها (RFLP و RAPD و AFLP) تعد مرتبطة بتشخيص الجينات النووية أكثر من السائتوبلازمية ، إلا ان طريقة (Complementary DNA = cDNA) تكون مرتبطة أكثر بمنطقة منظم النوية (Nucleolar Organizer Region = NOR) . استناداً لذلك، فإن هذه المعلمة الجزيئية مناسبة جداً لتأكيد طبيعة التغيرات الوراثي بين أفراد النباتات، فضلاً عن إعطائها صورة جيدة عن مستوى التطور المشترك بين تلك الأفراد. من جهة أخرى ، فإن هذه الطريقة غير قادرة على تشخيص حالة التركيب الوراثي من حيث المظاهر الأنتخابية أو التطبعية (selective-adaptive features) . يمثل تكنيك cDNA تقطيع mRNA وقعله الوراثي والذي هو نوع ثنائي الأبوته .

7. Farooq, S. and H. Sayyed. 1999. Isozyme markers in cotton breeding. II. Inter and intra-varietal variation in activity of isozyme peroxidase as affected by area of cotton cultivation. *Pak. J. Bot.* 31: 347-359.
8. Farooq, S. 2001. Marker-assisted plant breeding. In I. A. Khan and A. A. Khan (eds.). *Proc. International Sem., Univ. of Agric., Faisalabad, Pakistan*, p. 73-88.
9. Farooq, S. and F. Azam. 2002. Molecular markers in plant breeding. I: Concept and characterization. *Pakistan J. Biol. Sci.* 5 (10): 1135-1140.
10. George, M. L., E. Regalado, M. Warburto, S. Vasal and D. Hoisington. 2004. Genetic diversity of maize inbred lines in relation to downy mildew. *Euphytica* 135: 145-155.
11. Gillet, G. M. 1996. Quantitative inheritance analysis of isoenzymes in haploid gametophyte: Principles and a computerized method. *Silvae Genetica* 45: 8-16.
12. Gregorius, H. R. 1988. The meaning of generic variation within and between subpopulations. *Theor. Appl. Genet.* 76:974-951.
13. Hu, Z. L., P. Li, M. Q. Zhou, Z. H. Zhang, L. X. Wang, L. H. Zhu, and W. G. Zha. 2004. Mapping of quantitative trait loci for rice protein and fat content using doubled haploid lines. *Euphytica* 135: 47-54.
14. Metthes, M. C., A. Daly and K. J. Edwards. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP). In A. Karp, A. P. Isaac, and D. S. Ingram (eds.). *Molecular Tool for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, U. K., p. 183-190.
15. Murray, G., Y. Ma, J. Romero - Severson, D. P. West and T. H. Cramer. 1988. Restriction fragment length polymorphism: What are they and how can breeders use them? *Proc. 43 rd. Annual Corn and Sorghum Res. Conf., Washington, D. C. USA*, p. 72-78.
16. Teng, S., Q. Qian, D. Zing, Y. Kunihiro, K. Fujimoto, D. Huang and L. Zhu. 2004. QTL analysis of leaf photosynthetic rate and related physiological traits in rice. *Euphytica* 135: 1-7.
17. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, K. J. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531 - 6535.
- لأنجاز مثل هذه الأختبارات لتشخيص الجينوم وتحديد الأليلات وموقعها على الكروموسوم، كي يتمكن المربي من انتخاب الأفضل لتحسين نبات المحصول بسرعة أكبر. لدى وصول الباحثين في مختبر معين إلى مرحلة علمية معينة لتشخيص الأليلات ومواقعها على جينوم ذلك النبات، يمكن بعد ذلك اختصار الزمن اللازم لتطوير الأصول الوراثية المخطط لها كي تحمل جينات معينة مثل جينات المقاومة لمرض معين أو مقاومة مبيدات الأعشاب أو حشرة أو مرض معين، فضلاً عن إدخال جينات تضمن صفات إضافية أخرى في حاصل المحصول مثل جينات نسبة السكر أو البروتين أو الزيت وغير ذلك، من دون اضطراب في مجموعة الجينات المسؤولة عن الحاصل الجيد والتي يفقد جزء كبير منها في برامج التضييق الرجعي التقليدية، سيما أن الموقع الجيني الواحد في الذرة الصفراء يحوي ما بين 2-16 أليلًا مختلفًا وبمعدل أكثر من 5 أليلات مختلفة للموقع الواحد (10).
- المصادر
1. Ahloowalia, B. S. M. Maluszynski and K. Ninchterlein. 2004. Global impact of mutations derived varieties. *Euphytica* 135:187-204.
 2. Bergmann, F., H. R. Gregorius and F. Scholz. 1989. Isoenzyme: Indicators of environmental impact on plants or environmentally stable gene markers? In F. Scholz, H. R. Gregorius, and D. Rudin (eds.). *Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Population*. Springer-Verlag Heidelberg, N. Y, Tokyo, p. 17-28.
 3. Botstein, D., R. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage map in human, using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
 4. Elsahookie, M. M., A. M. Dahi, F. U. Jannu, A. S. Ahmed and A. K. Mohamed. 1999. Eighteen years to develop Ipasoy cv. of soybean in Iraq. *The Iraqi J. Agric. Sci.* 30 (1): 251-265.
 5. Elsahookie, M. M. 2005. An Introduction to Plant Molecular Biology. Ministry of Higher Education and Sci. Res., Univ. of Baghdad, Iraq, pp. 155.
 6. Farooq, S., N. Iqbal and M. Arif. 1996. Detection of genetic variability in Basmati and non-Basmati rice varieties and their radiation induced mutants through RAPD. In IAEA, TECDC 1010, Vienna, Austria, application of DNA Based Marker Mutations in Sexually Propagated Cereal Crops, p. 85-96.