دور التقانات الجزيئية في رسم الخرائط الوراثية وتقدير التباعد الوراثي والبصمة الوراثية

ماجد شايع حمد الله
قسم علوم المحاصيل الحقلية
كلية الزراعة/جامعة بغداد

المستخلص

ان دراسة الصفات المظهرية والحقلية لتقييم التباعد الوراثي وتحديد الصفات المرتبطة بالحاصل التي تستخدم في برامج التربية المختلفة يعد منهجاً تقليدياً لمربي النبات. ان التطور الحاصل في علم الاحياء الجزيئية، خاصة تقانات المعلمات الجزيئية وطرائق تحديد تتابع الجين وتحليل البيانات قد ادى الى ان تحل هذه الطرائق محل الطرائق التقليدية. ادى التطور الذي حصل في تقانة PCR(Polymerase Chain Reaction) بشكل خاص الى زيادة كفاءة التقانات الاخرى التي تعتمد عليها مثل RFLP و RAPD و SSLP و STS و SSR و DAF و AFLP و RPCP، Real time PCR وغيرها. تمتاز كل تقانة بأمتلاكها مزايا ونقاط ضعف خاصة، لذلك فان اختيار التقانة المناسبة هو قرار مهم للوصول الى الهدف المطلوب. يعتمد اختيار المعلمات الجزيئية على عمل مسح للتباعد الوراثي خلال وبين المجتمعات المدروسة الذي يُقدر على اساس الاختلافات بين مواقع جينية محددة. من بين اهم الصفات التي يجب ان تمتاز بها المعلمات الجزيئية التي يمكن الحصول عليها من Genomic Library او DNA Databases هي مقدرتها على انتاج قطع DNA عالية التغاير (polymorphism) ومقدرتها على التهجن الكامل مع المجسات وان تكون سهلة التمييز وقليلة التأثير في نمو النبات وذات تكلفة مناسبة في طرائق تمييزها. تهدف هذه الدراسة المرجعية الى التعريف بهذه التقانات وتسليط الضوء على دورها في رسم الخرائط الوراثية وتقدير التباعد الوراثي والبصمة الوراثية، علماً ان هذا العلم ذومجال يعتبر متجدد ودائم التطور.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 40 (3): 50-62 (2009) Hamdalla

THE ROLE OF MOLECULAR TECHNIQUES IN GENETIC MAPPING, GENETIC DIVERSITY AND FINGERPRINTING.

M. Sh. Hamdalla
Dept. Of Field Crop Sc./Coll. of Agric.
Univ. of Baghdad

Abstract

The study of morpho-agronomic characters for evaluation the genetic diversity and assesses the traits that are related to the yield and used in the different programs of breeding, are classical way for breeders. The development of bimolecular science, especially with the techniques of markers, molecular DNA sequencing and data analysis leads to replace the old approaches by these techniques. The advanced in PCR technique principally, leads to powerful the rest techniques which can be used for screening characterization and evaluation of genetic diversity like RFLP, RAPD SSLP, STS, SSR, DAF, AFLP, RPCP and Real time PCR, ...etc. Each technique has some merit and negativism, therefore, screening of genetic markers is an important to get the required result, and based on the survey of genetic diversity within and among populations. Genetic markers, which can obtained from Genomic library or DNA Databases, should be rapidly, safely, easy scored, full hybridization with probes, negligible effects on plant growth, in expensive scored and has the ability to produce high polymorphic fragments. The objective of this report is to identify the genetic markers and highlighted them role in genetic mapping, genetic diversity and fingerprinting but we should realize that the advances in this field so far and so varied.

المقدمة

ان المعلمات (Markers) مهمة لمربي النبات كمصدر للمعلومات الوراثية عن المحاصيل وذلك لاستعمالها في الانتخاب غير المباشر للصفات المرتبطة بهذه المعلمات. يعتمد مربوا النبات في طرق التربية التقليدية على المعلمات المظهرية (Phenotypic markers) كارتفاع النبات والمساحة الورقية ومكونات الحاصل، وعادة يبذل مربوا النبات جهوداً مضنية واوقاتاً طويلة للوصول الى الهدف المنشود. ان الانتخاب غير المباشر للصفات المظهرية قد لايكون مفيد بسبب 1- ندرة المعلمات المناسبة و 2- وجود ظاهرة الجين متعدد التأثير pleiotropic gene الضار للعديد من المعلمات المظهرية و 3- عدم امكانية تصنيف الصفات المظهرية الطافرة في الانعزالات الفردية للمجتمع المدروس (23).

لقد ادى استخدام المعلمات الوراثية (Genetic markers) الى زيادة ملحوظة في استخدام تقانات الوراثة الجزيئية (Molecullar genetic) (6)، اذ انها اصبحت اداة قوية بيد مربي النبات في انتخاب الصفات الاقتصادية المهمة وفي رسم الخرائط الوراثية Physical mapping وتحديد تتابعات الجينات وتقدير اوزان وحجوم قطع DNA بصورة نقية، فضلاً عن استخدامها في دراسة التباعد الوراثي Genetic Diversity بين التراكيب الوراثية(45). كذلك فقد اصبح استخدام البصمة الوراثية (DNA-fingerprint or DNA-typing) ضرورياً للحفاظ على هوية الاصناف المحلية والحفاظ عليها من الخلط الوراثي (29)،كما انها تستخدم في تمييز سلالات العقم الذكري(15 و25 و41 و42).فضلاً عن كونها اداة مهمة وكفؤة في حفظ وادارة المادة الوراثية(26). ان استخدام المعلمات الوراثية لم يقتصر على دراسة مجتمعات النباتات بل تجاوز ذلك ليشمل عوالم الاحياء المجهرية والحيوان والانسان. نظراً للحداثة النسبية للتقانات الحياتية التي تعتمد على المعلمات الجزيئية، فانه سيتم تسليط الضوء في هذه الدراسة المرجعية على اهم هذه التقانات.

التقانات الحياتية

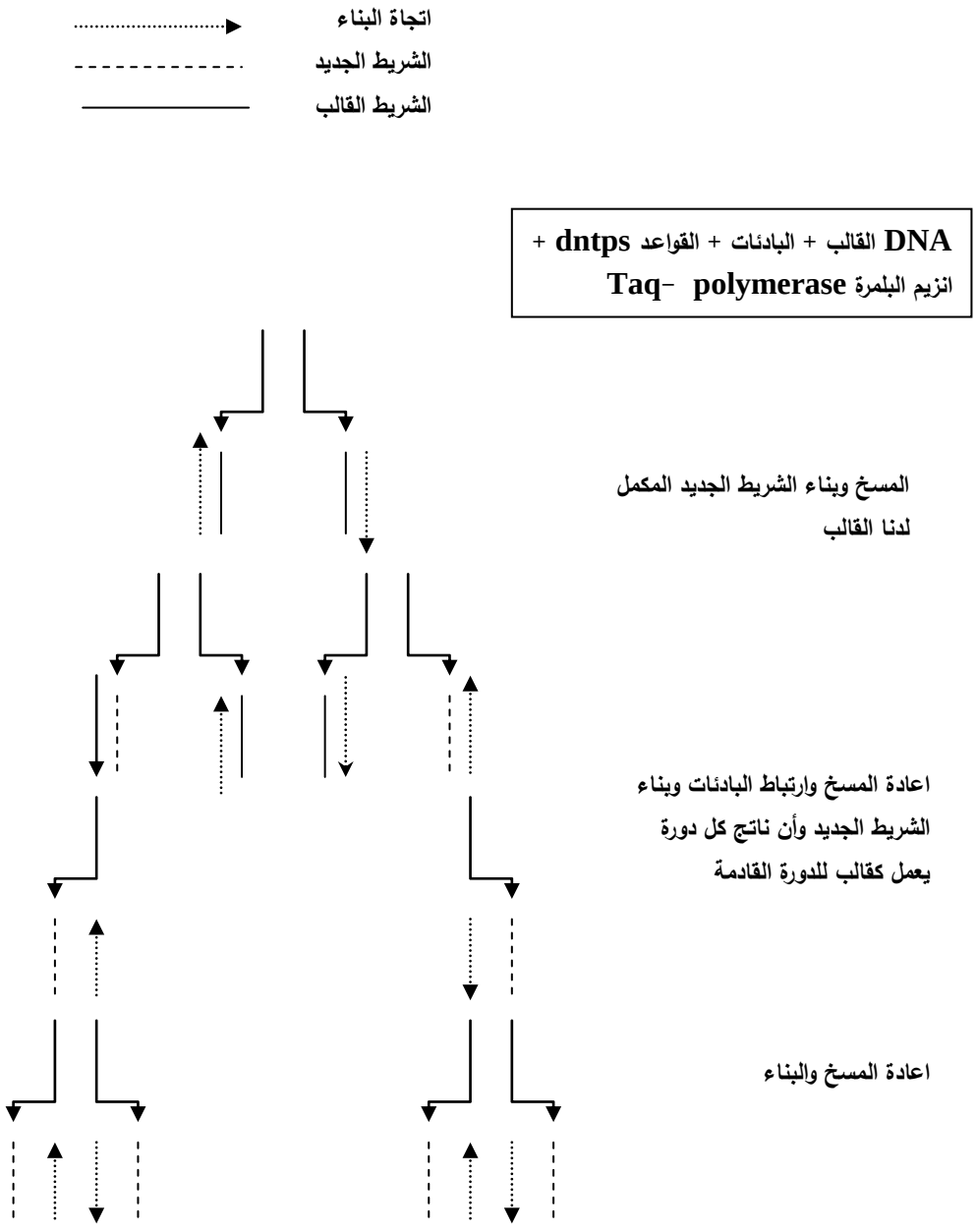
تستخدم في الوقت الحاضر العديد من التقانات الاحيائية وكل منها له استخداماته الخاصة التي تستند الى طبيعة عملها. سنكتفي باستعراض اهم التقانات الرئيسية التي تستخدم اليوم ضمن نطاق الابحاث العلمية بشكل واسع.

تقانة PCR

اكتشفت هذه التقانة عام 1985 من قبل Karry Mullis(13) ومنح عليها جائزة نوبل عام 1993. تدعى هذه التقانة بالتفاعل التضاعفي لسلسلة DNA (Polymerase Chain Reaction) لانها تعمل على مضاعفة قطع معينة او عشوائية من DNA خارج الجسم الحي (Invitro) باستخدام جهاز Thermal cyclerبمساعدة البادئات (primers) التي تتكامل مع شريط DNA القالب (Template) وانزيم تضاعف DNA (DNA-Polymerase I) للحصول على كميات كبيرة من قطع DNA، بالاضافة الى محلول منظم وقواعد نايتروجينية. ان عملية التضاعف تمر بثلاث مراحل هي: 1- فك الحلزنة (Denaturation) وتتم بدرجة حرارة 92-94 ْم، تقوم هذه العملية بفتح شريط الحلزون المزدوج (Double helix) بعملية تسمى Annealing والحصول على شريط مفرد من DNA (single strand) يعمل كقالب. 2- ارتباط او تكامل البادئ مع شريط DNA القالب وهذا يتم عند درجة حرارة 33-36 ْم والتي تعتمد على طول البادئ المستخدم ونوع القواعد النتروجينية المكونة للبادئ، اذ ان زيادة محتوى C≡G يؤدي الى رفع درجة الحرارة اللازمة للارتباط. ان البادئ هو شريط مفرد ذو طول محدد من القواعد النتروجينية (oliqonucleotides) تتراوح بين 9-25 mers وبتسلسل معين يمكن لها التعرف على التتابع المكمل لها في قطع DNA القالب. 3- استطالة السلسلة الجديدة باضافة القواعد الى البادئ بمساعدة انزيم التضاعف DNA-Polymerase I وبدرجة حرارة 70-75 ْم. ان هذا الانزيم يفقد فعاليته عند درجات الحرارة العالية اللازمة لفك حلزنة شريط DNA مما يتطلب اضافة كمية جديدة من هذا الانزيم في بداية كل دورة. في عام 1988 استطاع الباحث Saiki ان يستخدم الانزيم الثابت حرارياً والذي تم عزله من البكتريا المحبة للحرارة والتي تدعى

thermos aquaticus, الشكل (1) يمثل مخططاً بسيطاً لوصف خطوات PCR. ان اشرطة DNA الحديثة والمتكونة في كل دورة تعمل كقوالب للتفاعلات المتتابعة، وهكذا ستزداد عدد القطع في كل دورة بصيغة اسية.

ان الغاية الرئيسة من تقانة PCR هو مضاعفة قطع DNA لجين (او جينات) الهدف(target) بأعداد كبيرة وبالتالي يمكن ملاحظتها وقياس حجومها، فعلى سبيل المثال لو اننا اردنا الكشف عن وجود بكتريا معينة ذات تتابع معروف لقطعة محددة من DNA الخاصة بها في انسجة نبات مصاب بعدة انواع من البكتريا، فيمكن على هذا الاساس تصميم بادئ مكمل لتتابع قطعة DNA، وبعد استخلاص الـDNA المكون من DNA لانواع البكتريا المختلفة التي تصيب النبات و DNA النبات نفسه، نقوم باضافة البادئ ونجري عملية التضاعف. فأن حصلنا على حزمة محددة تمثل تكامل البادئ مع ذلك التتابع لقطعة DNA البكتريا، فهذا يعني وجود تلك البكتريا في انسجة ذلك النبات، اما في حالة عدم تكون اي حزمة فهذا يعني عدم وجود هذا النوع من البكتريا في انسجة النبات.



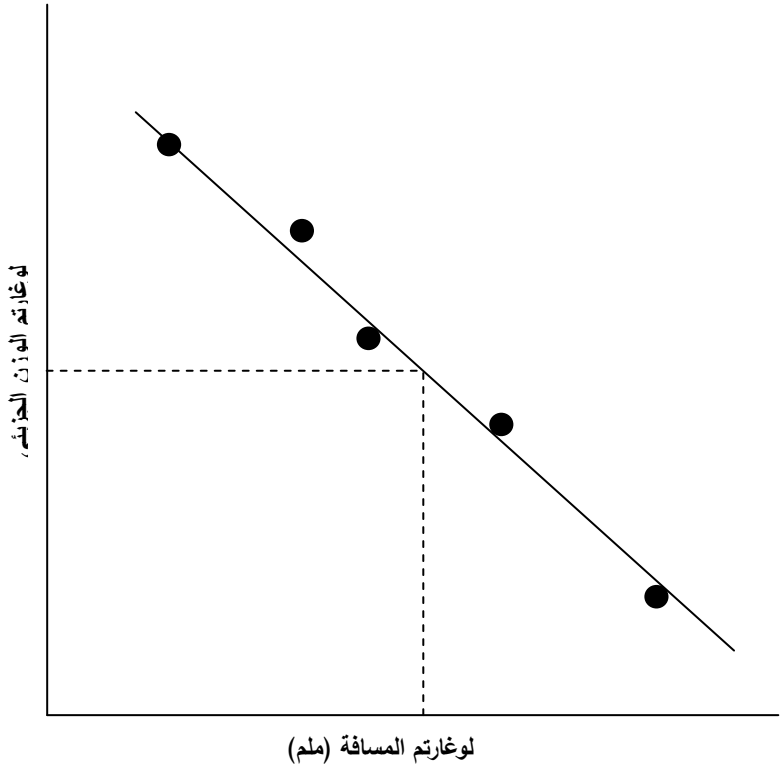
شكل1. مخطط التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA

يتم ملاحظة نمط توزيع الحزم وقياس حجومها بأستخدام تقنية الترحيل الكهربائي (Gel electrophoresis) التي تعتمد على استخدام نوعين من الهلام، الاول هو هلام الاجاروز (agarose gel) وهو

عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالاكتوز والمرتبطة مع بعضها باواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة. والنوع الثاني هو هلام البولي اكريلامايد (polyacrylamid gel) وهو ناتج من ارتباط مادة الاكريلامايد المتبلورة مع مادة بز اكرمايد (bis-acrymide) لتكوين شبكة معقدة ذات ثقوب اصغر قطراً من تلك الموجودة في هلام الاجاروز، لهذا فان هلام البولي اكريلامايد اكثر ملائمة في فصل قطع DNA الصغيرة التي يقل طولها عن 4 k.b. تتم عملية الترحيل الكهربائي باضافة قطع DNA المتضاعفة الى حفرة صغيرة في احدى نهايتي رقعة الهلام المحضر على شكل طبقة رقيقة فوق سطح زجاجي (slab)، ثم يمرر تيار كهربائي خلال الهلام، وبما ان جزيئات DNA تحمل شحنات سالبة فانها تتحرك نحو القطب الموجب بفعل التيار الكهربائي بسرع تتناسب مع اوزانها الجزيئية، ولهذا ستهاجر القطع الصغيرة لمسافات اطول من المسافات التي تقطعها القطع الكبيرة، وبالتالي تكون كل مجموعة من القطع المتماثلة بالطول حزمة محددة في موقع معين من الهلام.

بعد الانتهاء من عملية الترحيل الكهربائي فأنه يتوجب تعيين مواقع حزم DNA على الهلام لاجل معرفة اعدادها وتحديد حجومها. يتم ذلك عادة عن طريق تصبيغ الحزم بمادة بروميد الاثيريوم المتألقة ثم تُعرض الى الاشعة فوق البنفسجية لطول موجي مقداره n.m.300 ، وعندها ستتألق الصبغة المتحدة مع DNA باللون البرتقالي مما يتيح المجال لرؤيتها بسهولة. ان طريقة التصبيغ بمادة بروميد الاثيريوم تستخدم لكميات DNA التي تصل الى 0.05 microgram اما اذا كان التركيز اقل من ذلك فسيكون من الصعب ملاحظة الحزم المصطبغة، وفي هذه الحالة يستخدم التصوير الاشعاعي الذاتي، حيث يتم تعليم قطع DNA بمادة مشعة وغالباً ماتكون النظير المشع للفسفور (P^{32}) ثم ترحل كهربائياً، بعد ذلك يغطى سطح الهلام بفلم حساس للاشعة السينية، ونتيجة للاشعاع الصادر عن حزم DNA ستكون مناطق داكنة على الفلم تمثل مواقع الحزم المختلفة (2).

لاجل تعيين حجوم قطع الـDNA يتم الاعتماد على المسافات التي تقطعها عكسياً مع وزنها الجزيئي ولهذا سيعطي رسم العلاقة بين لوغارتم المسافات المقطوعة على الهلام واوزانها الجزيئية خطاً مستقيماً كما في الشكل (2). فلاجل تقدير حجوم هذه القطع المدروسة نقوم بترحيلها على الهلام بوجود قطع DNA معروف الحجم (دلائل حجمية)، وبعد انتهاء عملية الترحيل تقاس المسافة التي تقطعها الدلائل الحجمية ثم يرسم المنحنى القياسي الذي يمثل العلاقة بين لوغارتم المسافة المقطوعة ولوغارتم الوزن الجزيئي لهذه الدلائل. يستخدم هذا المنحنى القياسي فيما بعد لاستخراج حجوم قطع الـDNA المجهولة وذلك من خلال قياس المسافة التي تحركتها القطع المجهوله، وبعد وضع هذه القيم على محور المسافة، يقاطع المنحنى القياسي ثم تسقط كل قيمة عمودياً على محور الوزن الجزيئي لاجل تحديد الوزن الجزيئي لقطع DNA المجهولة. توجد طريقة اخرى لاستخراج حجوم DNA المرحلة باستخدام معادلات رياضية خاصة.



شكل 2. استخراج الوزن الجزيئي لقطع الدنا المرحلة كهربائياً بأستخدام المنحنى القياسي للدلائل الحجمية.

تقانة RFLP

وهي اول التقانات التي استخدمت لتحليل الجينوم ورسم الخرائط الوراثية (5)، واليوم تعتبر من التقانات الرئيسة التي تستخدم في مجال الوراثة الجزيئية، وتستند في عملها على وجود مواقع معينة في الجينوم تدعى (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP) وتلفظ riffip (34). في هذه التقانة يتم هضم DNA بواسطة انزيمات الحصر او التقييد (restrictive enzymes) التي تتعرف على تتابعات معينة وتقطعها في مواقع محددة لتنتج قطع طولية محددة مختلفة الاحجام وحسب عدد القواعد النتروجينية الداخلة في تكوينها، وهذا يعني ان المواقع الاليلية مختلفة الصيغ (AA عن aa) ستنتج اختلافات يتم ملاحظتها كتغير في الطول لقطع معينة من DNA. قبل الدخول في تفاصيل هذه التقانة لابد من التعريف بانزيمات التقييد.

اكتشفت انزيمات التقييد من قبل Stewart Linn و Werner Arber عام 1960 والتي تدعى restrictive endonucleases في بكتريا *E. coli* (34). جاءت هذه التسمية من وظيفتها التي تستند الى منع غزو اي DNA غريب للخلية البكتيرية، اي انها تقيد الفايروس الذي يهاجم الخلية، اذ تقوم هذه الانزيمات بتقطيع الـDNA الغريب في تتابعات معينة محدودة مكونة من 4 او 6 قواعد واحياناً 8. كذلك فانها تقوم بالقطع خلال DNA وليس من اطرافه، لذلك تم تسميتها endoncucleases (endo=within). تكمن فائدة انزيمات التقييد في: 1- انها تقطع شريط DNA في نفس الموقع، وهذه الخاصية هي القاعدة للعديد من التقانات المستخدمة لتحليل الجينات. 2- كما انها تقطع شريط DNA الى قطع متفاوته الاطوال بحيث تترك احدى القطعتين ذو نهاية لزجة تمكنه من الارتباط بقطع DNA محتلفة، اما في حالة القطع الوسطي فستنتج قطع غير حادة لاتستطيع الارتباط، فمثلاً انزيم التقييد EcoRI يقطع بالتتابع الاتي:

5'.....GAATTC.....3' ⟶ ..G3'+5'AATTC...

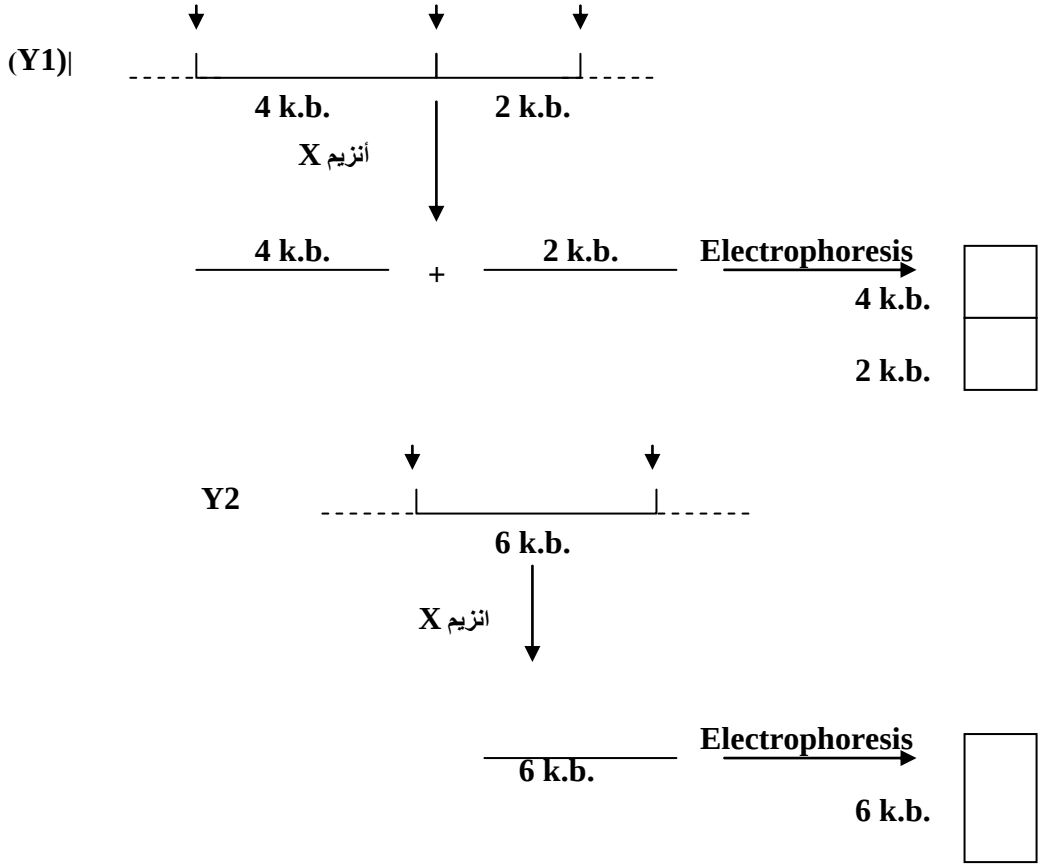
5'.....CTTAAG.....5' ⟶ ..CTTAA5'+3'G...

لذلك فهذا الانزيم ينتج اربعه قواعد يمكن ان تلتصق من النهاية (5') لكلا الشريطين.

لتوضيح اليه عمل تقانة RFLP ناخذ المثال الاتي:- نفرض وجود انزيم تقييد X يتعرف على التتابع

AUGCTT وتم استخدامه لتركيبين وراثيين هما Y1 و Y2، وكان التركيب الوراثي Y1 يحتوي على ثلاثة مواقع للـRFLP مفصولة عن بعضها بمسافة 2 و 4 k.b. يمكن ان يتعرف عليها الانزيم، والتركيب الوراثي Y2 يحتوي على موقعين من RFLP مفصولان عن بعضها بمسافة 6 k.b. (شكل 3). عند استخدام انزيم التقييد X لهذين التركيبين الوراثيين فان التركيب Y1 ينتج قطعتان من RFLP بطول 2 و 4 k.b.، اما التركيب Y2 فينتج قطعة واحدة من RFLP بطول 6 k.b.

يمكن تمييز الخطوات الاتية في هذه الطريقة (13): 1- استخلاص وتنقية DNA من تراكيب وراثية مختلفة. 2- هضم DNA مع عدد من انزيمات التقييد، كل انزيم على انفراد. 3- تعريض DNA المهضوم الى الترحيل الكهربائي وبشكل منفصل لكل عينة. الا ان جميع العينات ترحل على نفس اللوح، لذلك فقطع DNA الناتجة ذات الاطوال المختلفة لكل فرد ستنفصل عن بعضها. 4- نقل القطع الناتجة الى وسط صلب مثل مرشح نترات السليلوز (بصمة southern). 5- تهجين قطع DNA الموجودة في المرشح مع مجسات (Probes) معلمة بالفسفور المشع لذلك ستظهر قطع DNA التي تكاملت مع المجسات بشكل كامل او جزئي ويمكن ملاحظتها بواسطة Autoradiography وذلك بتعريض المرشح الى اشعة X او Ultraviolet.



شكل 3. مخطط يبين الية عمل تقانة RFLP

ان المجسات هي تتابعات معينة من القواعد النتروجينية تصنع مختبرياً بحيث تتكامل مع تتابع قطعة DNA معينة، الغرض منهاانتاج اعداد كبيرة من قطع DNA التي تمتلك مواقع حساسة لانزيمات التقييد عند معاملتها بانزيمات التقييد ، بينها كمية قليلة من قطع DNA التي تكون هي الهدف. ان جميع القطع الناتجة تظهر بشكل نقاط صغيرة لذلك نضيف المجس المُعلم والذي يكون ذو تتابع مكمل لتتابع قطع DNA المطلوبة والتي ستتهجن معها، ويمكن ملاحظة هذه القطع لانها ستكون مشعة وعندها يمكن عزلها او تحديد حجومها.

عند مقارنة تركيبين وراثيين او اكثر باستخدام انزيم تقييد معين، فان اختلاف المواقع الحساسة لهذا الانزيم بين التراكيب الوراثية سيؤدي الى ظهور الحزم في مواقع مختلفة. ان هذا يعني ان تقانة RFLP تعتمد على غياب المواقع الحساسة لانزيمات التقييد، لذلك ستزداد كفاءة هذه التقانة مع زيادة عدد اليلات الموقع الجيني الواحد وعلى ذلك فأن احتمال ان تُظهر سلالتان نقيتان قطع مختلفة الاطوال سيزداد عند وجود حالة تعدد الاليلات (Multiple alleles) كذلك في المحاصيل الخلطية التلقيح كالذرة الصفراء ،اذ انه يرتبط انتاج قطع عالية التغاير مع حالة الاليلات غير المتماثلة وراثياً (Heterozygous).

تقانة RAPD

ان توفر معلومات عن قطعة DNA المطلوبة (Target) يمكننا من تصميم بادئات لتلك المواقع الجينية حسب تتابعاتها ثم يجري تكثيرها باستخدام PCR. اما في حالة عدم توفر المعلومات فنلجأ الى استخدام بادئات عشوائية تستخدم لتضاعف قطع من DNA التي يصادف انها ذات تتابع مكمل لتتابع البادئات العشوائية المستخدمة، على هذا الاساس تم تسمية هذه الطريقة بالتضاعف العشوائي لقطع DNA المختلفة الاحجام (Random Amplified Polymorphic DNA=RAPD) والتي تلفظ rapid. ان هذا يعني ان البادئات المستخدمة لتركيب او تراكيب وراثية قد لاتعمل جميعها على احداث التضاعف، اذ انه قد لاتوجد مناطق في الجينوم ذات تتابع مكمل لبعض تتابعات البادئات المستخدمة وبهذا ستهمل جميع او بعض هذه البادئات وهذه من نقاط الضعف في هذه التقانة. عند مقارنة عدد من التراكيب الوراثية بهذه التقانة وكان احد هذه التراكيب مقاوماً لمرض معين والبقية حساساً، فعند استخدام بادئ عشوائي معين سنلاحظ تكون عدد من الحزم لكل تركيب وراثي متفاوتة الاطوال والمواقع. يمكن في هذه الحالة تحديد التتابع الذي يمثل جين المقاومة، اذ ان غياب الحزم عن موقع معين في جميع التراكيب الوراثية ووجودها في ذلك الموقع للتركيب الوراثي المقاوم سيعني انها القطعة التي نبحث عنها. كذلك يمكن وبالاعتماد على نمط وتوزيع هذه الحزم تقدير التباعد الوراثي بين تلك التراكيب الوراثية. ان تقانة RAPD مكملة لتقانة PCR وتمر بنفس خطواتها باستثناء ان البادئات تكون عشوائية ومتعددة. لتقانة RAPD عدة مزايا مقارنة مع RFLP لذلك يمكن استخدامها كبديل عن RFLP في عدة حالات، ومن اهم هذه المزايا هي: 1- طالما ان البادئات العشوائية يمكن استخدامها لانواع مختلفة لذلك لاتوجد حاجة لمجسات متخصصة لكل نوع كما في RFLP، فمثلاً البادئات العشوائية التي تعطي معلمات وراثية متعددة الاشكال (polymorphic markers) في الذرة الصفراء هي نفسها التي تعطي معلمات وراثية في فول الصويا والانسان (13). 2- ان طريقة RAPD اسرع من RFLP لان عدد خطواتها اقل. 3- ان تقانة RAPD يمكن ان تستعمل في حالة الاليل المفرد، بينما تقانة RFLP وغيرها تميز الاختلافات او التباعد الوراثي في حالة الاليلات المتعددة (37).

تقانة VNTR:-

ان ندرة قطع DNA معينة او انخفاض بنسبة تكرارها في المجتمع يزيد من صعوبة رسم الخرائط الوراثية باستخدام تقانة RFLP. على هذا الاساس نشأت فكرة تقانة VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) والتي تعتمد على استغلال مناطق DNA المكررة (Repetitive DNA) التي اكتشفت اول الامر في خلايا الفأر عام 1960 ومن ثم اثبت وجوده في جميع الكائنات الحية. ان هذا النوع من DNA عبارة عن نسخ مكررة على طول الجينوم لتتابعات متشابهة من القواعد النيتروجينية. تصل نسبتها في الكائنات الحية 20-90%، وعادة لاتحتوي هذه التتابعات على معلومات وراثية، الا انها تلعب دوراً منظماً. تسمى هذه التقانة احياناً minisatelite وقد وضعت من قبل Jeffery واخرون (14) وتم تطويرها من قبل Nakamura واخرون (20)، وهي عبارة عن تتابعات قصيرة ومكررة بطول 11-60 b.p.. تكون هذه التتابعات محاطة بمواقع حساسة لانزيمات التقييد. عند مضاعفة هذه التتابعات بأستخدام PCR ستنتج قطع مختلفة الاحجام، وبما ان قطع DNA الناتجة لهذه التتابعات القصيرة ونمط توزيعها سيختلف من شخص لاخر. لذلك سيكون من السهل رسم الخريطة الوراثية بالاعتماد على هذه التتابعات. ان من

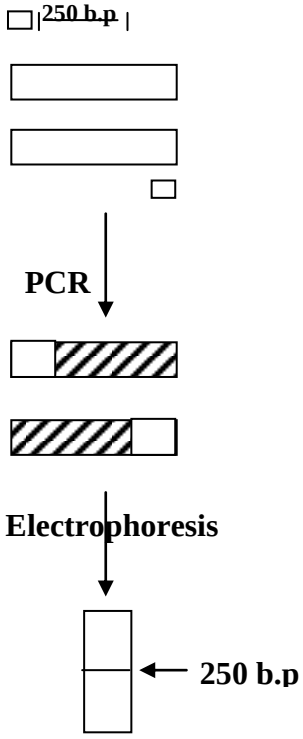
نقاط ضعف هذه التقانة هو ان هذه التتابعات تتمركز بصورة خاصة في مناطق Proterminal للكروموسوم.

تقانة SSR

تقانة مشابهة لتقانة VNTR من حيث انها تتابعات قصيرة ومتكررة تقع في مناطق Proterminal، الأنها تتكون من تتابعات بطول 2-4 b.p.(10 و30). تدعى هذه التقانة SSR (Simple Sequence Repeat) او microsatellites، تمتاز بانها تنتج قطع DNA متضاعفة عالية التغاير (polymorphic) مقارنة بالـVNTR (38 و 40). استطاع Jean Weisseabach وزملائة عام 1992(34) من انتاج خارطة ارتباطية لجينوم الانسان بالاعتماد على 814 موقع للـSSR يحتوي على التتابع C-A بشكل مكرر. تتميز هذه التقانة انها اكفأ من RFLP عند مقارنة تراكيب وراثية متقاربة (1).

تقانة STS

عبارة عن تتابعات قصيرة (Sequence Tagged Sites) بطول 60-1000 b.p. يتم مضاعفتها باستخدام PCR .تعتمد هذه التقانة التي اكتشفت من قبل kary mullic وزملائه على وجود مناطق ذات تتابعات محددة بالأطوال اعلاه(34).يبين الشكل (4) الية عمل هذه التقانة،فمثلاً لو كانت لدينا معلومات عن تتابع منطقة صغيرة من DNA لتركيب وراثي لمحصول معين،وتم على هذا الأساس تصميم بادئين يناسبان هذين التتابعين يبعدان عن بعضهما b.p.150 على جانبي الشريط.فعند اضافة البادئان الى محلول DNA ستتهجن مع التتابعات المكملة لها لمناطق STS وتسبب تضاعف قطع DNA .بعد عدة دورات من ال PCR ستتكون قطع كثيرة العدد بطول 150 b.p. يتم قياس اطوالها بأستخدام الترحيل الكهربائي للتأكد من انها القطع ذات التتابع المطلوب.عندها يمكن استخدام هذان البادئان مع PCR لأي قطعة DNA مجهولة التتابع،فأذا نتجت قطع بطول b.p.150 فهذا يعني ان هذه القطعة تحتوي على مناطقٍ STS قيد الدراسة.



شكل 4. مخطط يبين الية عمل تقانة STS

تقانة Real- Time PCR

ظهرت هذه التقانة نتيجة للحاجة الملحة لتقانات اكثر دقة لتشخيص قطع DNA الغريبة في النباتات التي تؤكل(12).تختلف هذه التقانة عن تقانة PCR التقليدية في انها تقيس كمية القطع المتظاعفة في جهاز PCR لكل دورة تضاعف،تمتاز هذه التقانة بانها تستلزم وقت اقل لأنها تحتاج الى وقت اقصر لفتح الشريط المزدوج(39)،كما انها حساسة لملاحظة قطع DNA وRNA(4 و7).بالأضافة الى انها تمتاز بالتخصص لملاحظة تتابعات محددة(18 و 27).

ان كل تقانة من التقانات اعلاه تمتلك عدد من المزايا الخاصة بها، لذلك فان اختيار التقانة المناسبة هو امر مهم (24)، لذلك اجريت الكثير من الدراسات للمقارنة بين العديد من هذه التقانات التي تعتمد على PCR (3 و9 و 11 و 17 و 32).

الارتباط الوراثي بين المعلمات الجزيئية والمعلمات المظهرية

يمكن استخدام المعلمات الجزيئية Molecular markers مثل RFLPs او RAPD وغيرها كمؤشرات وراثية بنفس الطريقة التي يستخدم فيها اي معلم مظهري Phenotypic marker كالمساحة الورقية وعدد العرانيص وغيرها من الصفات المرتبطة بالحاصل. ان هذا يعتمد على وجود ارتباط بين المعلمات الجزيئية والمعلمات المظهرية. يمكن دراسة علاقة الارتباط هذه من خلال فحص نمط قطع DNA الناتجة والتعابير المظهرية لابوين يختلفان مظهرياً وجزيئياً، فبواسطة التهجين بين مثل هذين الابوين وملاحظة نمط تكون قطع DNA للابوين وهجينهما يمكن تقدير تكرار التوليفات بين المعلمات الجزيئية والمعلمات المظهرية في الجيل الثاني الناتج من انعزالات الجيل الاول (الهجين). يستخدم هذا النوع من الارتباط في برامج التربية كذلك يستخدم كأداة لتطابق الاصناف في العديد من المحاصيل الزراعية. في السنوات الاخيرة تم استخدام السلالات الشقيقة (Near Isogenic Lines=NILs) في تحديد الارتباط بين المعلمات الجزيئية والمظهرية باستخدام التضريب الرجعي كنقل صفة المقاومة لمرض معين من الاب الواهب (D.P.) الى الاب المتكرر او المستلم (R.P.). ان نقل صفة المقاومة سيرافقه انتقال بعض المعلمات الوراثية الا ان 50% من المعلمات الوراثية المنتقلة من الاب الواهب الى الاب المستلم ستكون مرتبطة مع صفة المقاومة على نفس الكروموسوم ويمكن من خلال الانعزالات الناتجة عن التضريب بين .R.P و .NIL ان نحدد المسافة بين صفة المقاومة (المعلم الوراثي) وبين المعلم الجزيئي (13). بالرغم من وجود هذا النوع من الارتباط والفائدة التي يمكن ان تنتج منه، الا ان بعض التغيرات التي تحصل في مواقع المعلمات الجزيئية قد لاتؤثر في التعبير المظهري.

رسم الخرائط الوراثية

يعتمد رسم خرائط الارتباط Linkage mapping باستخدام المعلمات المظهرية على حدوث العبور الوراثي crossing over وتقدير التوليفات الناتجة recombination لتقدير المسافة بين الجينات المدروسة، الا انهما يتأثران بعدة عوامل من اهمها: 1- حدوث الطفرات mutation. 2- موقع الطفرات في الكروموسوم. 3- الظروف البيئية. 4- التعارض Interference.

وبالتالي فان المسافة المقدرة بين الجينات لخريطة الارتباط لاتكون دقيقة ولاتناظر المسافة المحسوبة على المستوى الجزيئي. يمكن استخدام المعلمات الجزيئة molecular markers التي اشتقت من تحليل DNA لرسم الخرائط الوراثية. ان جينوم DNA عندما يستخلص ويهضم بانزيمات التقييد ثم يرحل كهربائيا يتنج مصفوفات مستمرة ومختلفة الاحجام لقطع DNA، الا ان من الصعب تطبيق ذلك على كامل الجينوم، لذلك تستخدم قطع عشوائية او محددة التتابع لتحديد الاختلافات لاجزاء صغيرة من الجينوم. تسمى الخريطة الناتجة من استخدام انزيمات التقييد بخريطة التقييد restriction map، وتقاس المسافة بين المواقع الحساسة لانزيمات التقييد بعدد الازواج القاعدية (b.p.). بعد تحديد هذه المواقع للجين المدروس يتم مقارنة تتابع الاحماض الامينية للبروتين المشفر بواسطة هذا الجين. ان التغيرات الكبيرة في الخريطة الوراثية يمكن ملاحظتها بسهولة على خريطة التقييد، الا ان الطفرات لايمكن ملاحظتها بسهولة على خريطة التقييد وهذا بسبب ان المواقع الحساسة لانزيمات التقييد ذات تأثر قليل بالطفرات وهذا هو الجانب الضعيف في هذه الطريقة.

توجد بعض التقانات التي تدعم وتتكامل مع تقانات رسم خرائط التقييد باستخدام انزيمات التقييد والترحيل الكهربائي لأكمال رسم الخرائط الوراثية بدقة اعلى مثل Partial digest و end labeling و hybridization.تعتمد تقانة Partial digestعلى الهضم الجزئي لل DNA باحد انزيمات التقييد مما ينتج عنه قطع DNA باطوال معينة تختلف عن اطوال نظيرتها المعرضة للهضم التام.فمثلاً لو كان لدينا قطعة DNA بطول 3000 b.p. تم هضمها بشكل كامل وحصلنا على اربع قطع بالأطوال 500و700و800و1000 b.p. وعرضنا نفس القطعة الى الهضم الجزئي وحصلنا على ثلاث قطع بالأطوال 500و1500و1000 b.p. ،فعند المقارنة بين اطوال المجموعتين سنستنتج ان القطع بالأطوال 700و800 b.p. متجاورة ضمن ترتيب خطي.اما تقانة end labeling فتعتمد على تعليم اطراف الكروموسومات(Telomeres) باحد النظائر المشعة قبل هضمها باحد انزيمات التقييد،فالقطع المعلمة بالأطوال المختلفة والناتجة من الهضم هي قطع طرفية تساعد في تحديد الترتيب الخطي لقطع ال DNA المدروسة.اما تقانة hybridization فتقوم على اساس التهجين بين قطع ال DNA الناتجة من الهضم.بالرغم من ان التقانات اعلاه ترفع من درجة دقة رسم الخرائط الوراثية،الا انها تتطلب انتاج قطع لجميع الجينوم وهذا امر في غاية الصعوبة والتعقيد وليس من السهل تحديده، لذلك استخدمت تقنية RFLP في العقد الاخير لانتاج الخرائط الوراثية في العديد من الكائنات كالانسان والفأر والماشية والنيماتودا والعفن والذرة الصفراء والحنطة والشعير والرز والطماطا والبطاطا وغيرها (13). ان الخطوة الاولى لتحضير خارطة وراثية بالاعتماد على تقنية RFLP هو الحصول على اعداد كبيرة من تتابعات DNA الفردية وتحديد اي من هذه الكلونات هو الاكثر كفاءة في انتاج قطع متغايرة الاحجام او الاشكال (polymorphism). تستخدم المعايير الاتية لتحديد المكونات المفيدة وهي: 1- يجب ان تتهجن بشكل كامل مع المجسات. 2- يجب ان تعطي قطع متغايرة الاحجام بشكل عالي. 3- ان تكون هذه القطع سهلة التمييز. 4- ان تكون قليلة التأثير في نمو النبات. 5- ان تكون طرق تمييزها وتصنيفها غير مكلفة (19 و 28 و8).

الخطوة الثانية لتحضير الخارطة الوراثية هو عمل تضريبات بين الخطوط النقية التي تظهر قطع DNA عالية التغاير، وبعد الحصول على الجيل الاول (F1) يلقح ذاتياً او رجعياً لانتاج انعزالات الجيل الثاني (F2 او B.C.)، وعندها يمكن استخدام قطع RFLPs للأباء و F1 و F2 او B.C. لرسم الخارطة الوراثية وباستخدام برامج حاسوب مثل MAPMAKER او LINKAGE (16). كذلك يمكن استخدام تقانات RAPD و SSR و VNTR مع RFLPs والمعلمات المظهرية للحصول على خرائط وراثية متكاملة.

البصمة الوراثية

لقد ذكرنا انه توجد مناطق للـDNA ذات تتابعات قصيرة ومكررة بشكل كبير على طول الجينوم تسمى VNTR loci، وان الافراد يختلفون فيما بينهم في نمط ونسبة وتكرار هذه التتابعات. ان هذا النمط شبيه لنمط البصمة الوراثية لاصابع اليد لذلك سميت هذه التقانة بالبصمة الوراثية (Fingerprint او DNA-Typing). ان الافراد لايمكن ان تتشابه في هذه البصمة لانها ستختلف ولو قليلاً فيما بينها في قطع VNTR باستثناء الافراد التوأم الناتجة عن بويضة واحدة منقسمة monozygote. تستخدم الان البصمة الوراثية في علم الادلة الجنائية، اذ ان اي خلية حية يمكن ان يستخلص منها DNA ويعمل له فصل الى قطع مختلفة الاحجام باستخدام احدى التقانات السابقة وبالتالي يمكن ان يتم ادانة او تبرئة الشخص المتهم. كذلك فانها تستخدم في قضايا اثبات الابوة. اما في المجال الزراعي فأن دورها مهم في تحديد الهوية الوراثية للاصناف للحفاظ عليها من الخلط الوراثي.

في جميع التقانات التي تم استعراضها نحتاج بعد الانتهاء من ترحيلها الى برامج حاسوب لتصنيف التراكيب الوراثية وتقدير درجة التباعد او الارتباط الوراثي. ومن اشهر هذه البارمج هو برنامج UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis) وبرنامج D^2 analysis وغيرها.

المصادر

1. Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki,and T. Fujimura.1997.Highly polymorphic microsatellite of rice consist of AT repeats,and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci.Theor.Appl.Genet.94:61-67.

2. AL- bakri,GH.H.1991.Principle of Genetic Engineering. Ministry of Higher Education, Univ. of Basra ,Iraq,pp.167.

3. Archak, S, B. Gaikwad, D. Gautam, V. Rao, M. Swamy,and L. Karihaloo 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (Anacardium occidentale L.) accessions of India. Genome 46: 362-369.

4. Bago, B, W. Zipfel, RM, Williams, J. Jun, R. Arreola, PJ. Lammers, P. Pfeffer, Y. Shachar Hill. 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Physiology 128**,** 108–124.

5. Botstein, D, R. White, M .Skolnick,and R. Davis. (1980). Construction of agenetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Genet. (32): 314 – 331.

6. Bretting, P.K,and M.P Widrlechner. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. Plant Breeding Reviews, V(13) P: 11- 86.

7. Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. **25,** 169–193.

8. Chunwongse, J.G., B. Martin,and S. Tanksley. 1993. Pregermination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds.Theor. Appl. Genet. 86: 694-698

9. Corazza, M., M. Machado, W. Nunes, M. Cristofani,and M. Targon 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (Citrus paradise Macf.) and Pummelos (C. maxima (Burn) Merr) usingRAPD and SSR markers. Euphytica 126:169-176.

10. Cregan, B. 1992. Simple sequence repeat DNA length polymorphisms. Probe 2: 18-22.

11. Ferdinandez, Y., B. Coulman. 2002. Evaluating genetic variations and relationships among two bromegrass species and their hybrid using RAPD and AFLP markers. Euphytica 125: 281-291.

12. Gachon,C.,A.Mingam, and B.Charrier.2004.Real time PCR :what relevance to plant studies?. J. of Exp.Botany.55(402):1445-1454.

13. Gupta,P.K.2007.Cytogenetics.Rajsons printers,NewDelhi,India,pp348.

14. Jeffrey, A.J., V. Wilson,and S.L. Thein. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature.314:67-73

15. Jena,K.K., and S.K.Pandely.1999.DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. Hybrid Rice Newsl.2:13-14.

16. Lander,E.S.,P.Green,J.Abrahamson,A. Barlow,M.J.Daly,S.E.Lincoin, and L.Newburg.1987.Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and nature populations.Genomics.1:174-181.

17. McGregor ,C., C. Lambert, M. Geryling, J. Louw,and L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) germplasm. Euphytica 13:135-144.

18. Montrichard, F, M, Renard, F. Alkhalfioui, FD. Duval , D. Macherel. 2003. Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. *Plant* Physiology 132, 1707–1715.

19. Murray,M.G.,J.M.J.Romero,D.P.West, andJ.H.Cramer.1988.Restriction fragment length polymorphism :what are they and how can breeders use them?Proc.Annu.Corn Sorghum Res.Conf.43:72-87.

20. Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin,and R. White. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science.235:1616-1622.

21. Ni,J.,P.M.Colowit,J.Joster,K.Xu,andD .J.Mackill.2001.Molecular markers linked to stem rot resistance in rice.Theor.Appl.Genet.102:511-516.

22. Palombi, M.,and C. Damiano, 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variations in kiwifruit (*Actinida deliciosa A. chev*.). Plant Cell Rep. 20 (11): 1061-1066.

23. Randes,S.A.,F.Nuzhat,B.Esha,and V.Anjali.2001.Gene tagging with random amplified polymorphic DNA(RAPD)markers for molecular breeding in plants. Critical Reviews In Plant Sciences.20(3):251-275.

24. Saker,M.M., S.S.Youssefm, N.A. Abdalla, H.S. Bashandy,and A.M.EL-sharkawy.2005.Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD,SSR and AFLP. African J. of Biotechnology.4 (9):882-890.

25. Sane,A.P.,P.Seth,S.A.Ranade,P.Nath,P.V.San e.1997.RAPD analysis of isolated mitochondria DNA reveals heterogeneity in elite wildabortive(WA)cytoplasminrice.Theor.App l.Genet.95:1098-1103.

26. Schoen,D.J., and A.D.Brown.1995.Maximising genetic diversity in core collections of wild relatives of crop species.p:55-76.In:T.Hodgkin (ed).Core Collections of Plant Genetic Resources. John Wiley and Sons, U.K.

27. Shimada Y, H. Goda, A. Nakamura. S. Takatsuto, S. Fujioka, S. Yoshida. 2003. Organ- specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in Arabidopsis. Plant Physiology 131, 287–297.

28. Smith J.S.C. 1989. Gene markers and their uses in the conservation, evaluation, and utilization of genetic resources of maize (*Zea maydis* L.). P. 125-138. In H.T. Stalker and C. Chapman (eds.). Scientific management of germplasm: characterization, evaluation, and enhancement. IBPGR training courses: lecture series, 2. Dept. of Crop Science, North Carolina State, Univ. Raleigh, NC and IBPGR, Rome.

29. Smith, J.S.C.,and O.S. Smith. 1992. Fingerprinting crop varieties. Adv. Agron. 47: 85-140

30. Tatuz,D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res.17:6463-6471.

31. Tingey.1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res.18, 6531–6535.

32. Virk, S, J. Zhu , H. Newbury, G. Bryan, M.Jackson, B. Ford-Lloyd. (2000). Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. Euphytica112: 275-284.

33. Vos, P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T .Van de Lee, M. Hornes, A.Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper,and M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.

34. Weaver,R.F.,andPH.W.Hedrick.1997. Genetics.Wm.C.Brown Publishers.U.S.A.pp.475.

35. Welsh, J., andM. McClelland.1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res., 18, 7213–7218.

36. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V.Tingey.1990.DNA polymorphism amplified by arbitrary primers. Nucleic Acids Res.18:6531-6535.

37. Williams, C .E., and D.A.S.Clair.1993.Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accession of Lycopersicum esculentum.Genome.36:619-630.

38. Wu, K,and S. Tanksley 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol. Gen. Genet. (241): 225-235.

39. Wurmbach, E, T. Yuen, SC**.** Sealfon. 2003. Focused microarray analysis. Methods 31**,** 306–316.

40. Yang G.P, M. Maroof, C. Xu, Q. Zhang, R. Biyashev. 1994. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism inland races and cultivars of rice. Mol. Gen. Genet. (245):187-194

41. Yashitola,J., R.M.Sundaram, S.K.Biradar, T.Thirumuyugan, M.R.Vishnupriya,Rajeshwari, B.C.ViraktamathR. N.P.Sarma, and

R.V.Sonti.2004.A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines.2004.Crop Sci.44:920-924.

42. Yashitola,J.,T.Thirumuyugan,R.M.Sundaram,M.K.Naseerullah,M.S. Ramesha, N. P. Sarma, and R.V.Sonti.2002.Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. Crop Sci.42:1369-1373.

43. Yerramsetty,P.N.,M.P.anderson,CH.M.TaliaferroandD.L.Martin.2005.DNA Fingerprinting of seeded bermudagrass cultivars. Crop Sci.45:772-777.

44. YG., Ch.,I.Ishii, S.themnkh, X.Chen, l.Lipovich, S.R.McCouch, W.D.Park, N.A.yres and S.cartinhour.2000.Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GeneBank.722.

45. Zhang,Q.F.,M.A.S.Maroof,T.Y.Lu,andB.Z.Shen.1992.Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis.Theor.Appl.Genet.83:459-499.