٣ – بينما تكون غالبية المعلمات الأيزوزيمية ومعلمات الـ RFLP ذات تأثير محايد على الشكل المظهرى فإن المعلمات المورفولوجية تُحدث – غالبًا – تأثيرات كبيرة على الشكل المظهرى، كثيرًا ما تكون ضارة فى عشائر التربية.

٤ – كثيرًا ما تمنع تفاعلات السيادة والتنحى تمييز كل التراكيب الوراثية ذات الصلة بالصفات المورفولوجية، بينما تسلك جميع المعلمات الجزيئية سلوك السيادة المشتركة

٥ - تحدث تفاعلات كثيرة غير مرغوب فيها بين المواقع الجينية المتحكمة فى المعلمات الموفولوجية، يمكن أن تحد من عدد المعلمات المنعزلة التى يمكن تقييمها فى العشيرة المنعزلة الواحدة. هذا بينما نجد أن معظم المعلمات الجزيئية تبدو خالية من تأثيرات التفوق، بما يعنى إمكان متابعة أى عدد من العوامل الوراثية فى العشيرة الواحدة (عن Stuber ١٩٩٢).

تقنيات تداول الدنا وإكثاره وأنواع المُعَلِّمات الجزيئية

نتناول بالذكر والشرح الموجز تحت هذا العنوان التقنيات التالية:

تقنية الـ Polymerase Chain Reaction

تعرف هذه التقنية – اختصارًا – باسم PCR، وهى تستخدم فى الإكثار غير المحدود لأى جزئ يتم عزله من الدنا (جين كامل أو جزءًا من جين)، باستعمال أجهزة خاصة صممت لهذا الغرض، يتم عن طريقها محاكاة عملية الاستنساخ الطبيعية للجينات.

ومن أهم مزايا وعيوب هذه التقنية، ما يلى:

المزايا

يتحقق بالـ PCR المزايا التالية:

١ – يمكن بواسطتها إنتاج كميات كبيرة من جزيئات الدنا المتماثلة من كمية متناهية الصغر، هى التى تستخدم كبداية. وفى الواقع فإن الدنا المعزول من خلية مفردة (حتى ولو كان من بروتوبلاست نباتى) يكفى لاستمرار واستكمال العملية

٢ – تعد التقنية سريعة وبسيطة.

٣ – تعد التقنية شديدة الحساسية

٤ – لا يلزم أن يكون الدنا نقيًا لأجل إكثاره وتضخيمه، شريطة ألاّ تحتوى العينة على شوائب يمكنها تثبيط الـ Taq polymerase

العيوب

إن من أهم عيوب الـ PCR، ما يلى

١ – يجب أن تعرف تتابعات النيكليوتيدات – على الأقل – فى الأجزاء الحدودية لجزيئ الدنا، بما يسمح للـ oligonucleotide primers بالالتحام وتمثيل الدنا وهذا الشرط يقصر استعمال تقنية الـ PCR على الجينات التى تمت دراستها وتوصيفها – ولو جزئيًا – بطرق الـ cloning

٢ – تعد الـ PCR تقنية شديدة الحساسية، وقد تعطى إشارات خاطئة، وهى التى تنتج – غالبًا – من ملوثات من الدنا تتواجد فى الجهاز من استعمال سابق له (عن Chawla ٢٠٠٠).

الأيزوزيمات (الأيزوإنزيمات والأللوزيمات)

يُعنى بالمصطلح أيزوزيم isozyme (أو أيزوإنزيم isoenzyme) – فى معناه الواسع – أى بروتينين يمكن تمييزهما عن بعضهما البعض، حيث يكون لكل منهما نشاط حركى مختلف وإن كانا يقومان بتحفيز نفس التفاعل الكيميائى الحيوى. وتعد الأيزوإنزيمات مجموعة من الجينات المتقاربة multigene family، قد تظهر بها اختلافات ثانوية فى تتابع قواعدها الآزوتية

تستخدم عديد من التقنيات الكيميائية الحيوية فى تمييز الأيزوإنزيمات المختلفة، إلاّ أن أكثر الطرق استعمالاً من قبل باحثى الوراثة وتربية النبات هى طريقة الفصل الكهربائى الأفقى التى تعرف باسم horizontal starch gel electrophoresis، والتى تفصل البروتينات – أساسًا – على أساس الشحنة والحجم

وقد أظهرت الدراسات الكيميائية الحيوية والوراثية على طبيعة الأيزوزيمات عدة طرز مختلفة من التباينات، حيث أمكن تمييز ما لايقل عن سبعة أقسام مختلفة من

الأيزووزيمات، يهمنا منها قسم أو فئة الأيزوزيمات التى تنتج بفعل التعدد الآليلى allelic polymorphism على المستوى الجينى، والتى تعرف باسم أللوزيمات allozymes، والتى يكون من الممكن - غالبًا - الربط بين أى منها وصفات معينة، مما يجعلها مفيدة كثيرًا فى مجال التربية.

ومن بين الوسائل الأخرى التى يمكن استعمالها فى تحليل الأللوزيمات، ما يلى:

١ - تقنية الـ polyacrylamide gel electrophoresis (أو PAGE).

٢ - تقنية الـ isolectric focusing (أو IEF) على جل من الـ agrose أو الـ polyacrylamide (عن Weeden ١٩٨٩).

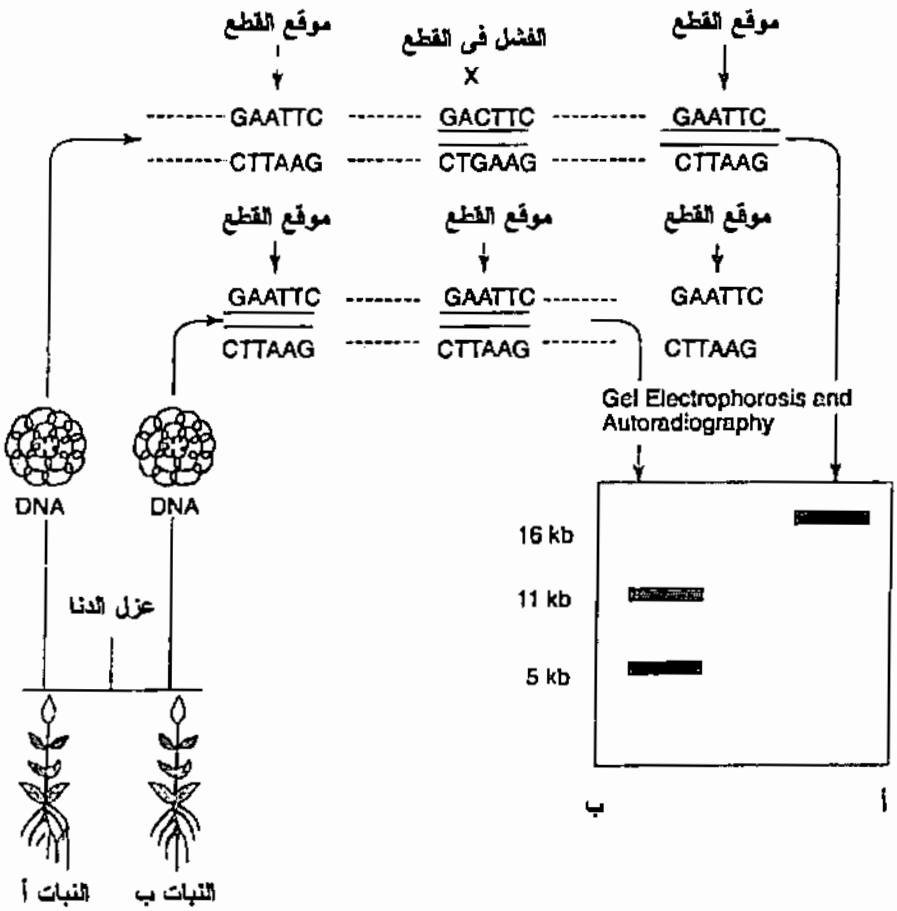
تقنية الـ Restriction Fragment Length Polymorphism

تعرف هذه التقنية - اختصارًا - باسم RFLP، وهى تعد أكثر التقنيات استعمالاً فى عمل الخرائط الكروموسومية الجزيئية لمختلف الأنواع النباتية. وتعتمد تلك التقنية على الاستفادة من الاختلافات فى تتابع النيكليوتيدات التى تقوم عندها الإنزيمات القاطعة restriction enzymes بقطع شريط الدنا. وتتضمن التقنية استخلاص الدنا، ثم هضمه بمجموعة مختارة من الإنزيمات القاطعة، وفصل القطع الناتجة بالـ electrophoresis، وسبر (أوجسّ) الـ blot بأجزاء معلومة من الدنا (فيما يعرف باسم Southern blots).

تورث الـ RFLPs بنظام السيادة المشتركة، كما تكثر بها الآليلات. ويمكن الوثوق فى تماثل القطع ذات التحرك الكهربائى المتماثل إذا ما وضع المجس فى موقع جينى معين ويؤخذ على هذه التقنية احتياجها إلى كميات كبيرة من الدنا لإجراء التحليل، وتكلفتها العالية. واحتياجها لوقت طويل، مما جعلها أقل صلاحية للاستخدام على نطاق واسع فى برامج التربية (عن Bretting & Widrlechner ١٩٩٥، و Taji وآخرين ٢٠٠٢).

يتم تحليل التباين عند مستوى الدنا بتقطيع الدنا الكامل للفرد باستعمال إنزيمات القطع restriction enzymes، وهى إنزيمات تتوفر فى البكتيريا التى تستفيد منها كوسيلة للدفاع بها ضد الفيروسات. يتعرف كل restriction enzyme على موقع محدد من الدنا - يتكون - عادة - من ٤-٨ أزواج من القواعد، ينشط عندها فى قطع خيطا

الدنا. توجد تلك المواقع فى أماكن عديدة من جينوم الفرد الواحد، الأمر الذى يترتب عليه تقطيع أوصال الدنا - بإنزيم واحد - إلى عدد كبير من القطع، ويتوقف طول كل قطعة على المسافة بين مواقع التقطيع. ويمكن باستعمال الـ electrophoresis للدنا المصبوغ التعرف على قطع الدنا ذات الأطوال المختلفة (شكل ٩-١)، إلاّ أن عدد القطع يكون كبيرًا جدًّا؛ الأمر الذى يجعل من الصعب ملاحظة كل قطعة على انفراد. ولهذا يتم خفض عدد القطع بالغربلة باستعمال مجسات تتهجن مع بعض القطع فقط؛ وهى التى تكملها وتتطابق معها، ويمكن التعرف عليها بالـ autoradiography.



شكل (٩-١): تمييز أجزاء من الدنا باستعمال تقنية الـــ AFLP (عـــن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

وقد استخدم مصطلح RFLP لوصف هذا التباين الخاص بكل تركيب وراثى – والذى يظهر بالـ autoradiography – والذى يتحدد بأطوال قطع الدنا.

ويتحدد مدى الـ polymorphism، بالـ restriction enzyme المستعمل وترتيب القواعد فى المجس؛ ولذا .. تستخدم عدة مجسات و restriction enzymes.

ويتم تقييم كل الأفراد فى عشيرة منعزلة مثل الجيل الثانى لكل توليفة من الإنزيم والمجس. يقارن الـ banding pattern بين الأفراد، ويعامل التباين – المتحصل عليه بإنزيم معين فى كل قطعة دنا – كـ RFLP واحد.

ويمكن الحصول على المجسات إما من الـ cDNA library، وإما من الـ genomic library (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

كانت الـ RFLP أولى التقنيات استخدامًا وانتشارًا فى تحليل الاختلافات فى الدنا النباتى، وتتوفر حاليًا خرائط RFLP لعديد من الأنواع النباتية، كما يتوفر عديد من مجسات الـ RFLP (أى RFLP probes) من دراسات الخرائط؛ بما يسمح باختيار مجموعة من المجسات لمسح وفحص الهيئة الوراثية بحثًا عن أى تغيرات فيها. توفر معلمات الـ RFLP (أى RFLP markers) وسيلة فعّالة لتحليل الهيئة الكروموسومية النباتية لتعرف أى تباينات وراثية جديدة، حتى ولو كان التغير فى قاعدة آزوتية واحدة ويعيب هذه التقنية عدم توفر المجسات المناسبة لعد كبير من الأنواع النباتية القليلة الأهمية (عن Henry ١٩٩٨).

تقنية الـ Random Ampilified Polymorphic DNA

تعرف هذه التقنية – اختصارًا – باسم RAPD، وهى – كذلك – تسمح بمسح الهيئة الكروموسومية بحثًا عن أى تغيرات وراثية. تقود هذه الطريقة عند استعمالها إلى توليد معلمات جزيئية يمكن تحليلها بسهولة بطريقة الفصل الكهربائى على جل الأجاروز، ومع استعمال صبغة الـ ethidium bromide. تتميز هذه الطريقة ببساطتها وعدم حاجتها المسبقة إلى مجسات مناسبة، ولذا .. فهى تعد من أكثر الطرق شيوعًا فى تحليل تباينات المزارع.

بينما يمكن باستعمال تقنية الـ RFLP التعرف على الآليلات المختلفة للجين بدقة كبيرة، فإن تقنية الـ RAPD تُفيد فى التعرف على عدد أكبر من المواقع الجينية وتستعمل كمعلمات لكل الهيئة الكروموسومية. وهى أسهل استعمالاً، ولا يلزم لتطبيقها أكثر من ١٠-١٥ نانوجرامًا من الدنا (مقارنة بالحاجة إلى نحو ٢-١٠ ميكروجرامًا من الدنا فى حالة تطبيق تقنية الـ RFLP)، كما أنها لا تتطلب استعمال النظائر المشعة ويعتقد بأن تقنية الـ RAPD مناسبه - خاصة - لرسم خرائط جينات الصفات الكمية، كما يمكن استعمالها فى التعرف على الهجن الجسمية، وفى تخطيط استراتيجيات تقييم وحفظ الأصول الوراثية (Waugh & Powell ١٩٩٢)

تعتمد تقنية الـ RAPD على تقنية الـ PCR، حيث يستعمل primer مفرد قصير من النيكليوتيدات (a single short oligonucleotide primer) يمكنه الالتحام مع مواقع كثيرة يستعمل فى تضخيم وإكثار تتابعات عشوائية من قالب template معقد من الدنا مثل جينوم النبات وفى معظم النباتات يتوقع من الـ primers التى تتراوح أطوالها بين ٩، و ١٠ نيكليوتيدات أن يتولد منها ٢-١٠ نواتج إكثار وتضخيم amplification products تكون الـ primers غالبًا ذوات تتابعات عشوائية، وإن كانت منحازه لتحتوى على ٥٠٪ على الأقل من الـ GC، وتفتقد إلى التكررات الداخلية يمكن فصل نواتج الإكثار والتضخيم بسهولة بتقنيات الفصل الكهربائى العادية وتميز بالأشعة فوق البنفسجية ينتج الـ polymorphism عن التغيرات التى تحدث إما فى تتابع مواقع الالتحام بالـ primer (طفرات عاملية)، وإما عن التغيرات التى تحور الحجم أو تمنع تضخيم الدنا المعنى (حالات الفقد والإضافة والانقلاب). هذا وتورث نواتج التضخيم كمعلمات سائدة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

تقنيات أخرى

من بين التقنيات الأخرى - التى تعتمد على تقنية الـ PCR - وتستخدم فى التعرف على المواقع الجينية المتعددة الطرز (الـ polymorphic)، ما يلى:

التقنية	الاسم المختصر
DNA Amplification Fingerprinting	DAF
Amplified Fragment Length Polymorphism	AFLP
Short Sequence Repeats	SSRs
Simple Sequence Repeats أو	SSRs
Short Tandem Repeats أو	STRs
Temperate Gradient Gel Electroporesis	TGGE
Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	DGGE
Sequence Characterized Amplified Region Markers	SCAR
Arbitrarily-Primed PCR	AP-PCR
Allele Specific PCR	AS-PCR
Cleaved Amplified Polymorphic Sequences	CAPS
Single Strand Conformational Polymorphism	SSCP
Microsatellite	µsat

أهمية المُعلّمات الوراثية لمربى النبات

لكل طراز من المعلمات الوراثية أهميته الخاصة فى مجال تربية النبات، كما أن لها استعمالات عامة، كما يأتى بيانه.

أهمية المعلّمات الأيزوإنزيمية

إن للمعلمات الأيزوإنزيمية (الأللوزيمات) استعمالات كثيرة فى مجال تربية النبات، كما يلى:

١ – وصف وتمييز مجاميع الأصول الوراثية والأصناف التجارية.

تستعمل المعلمات الأيزوزيمية – فى مجال مجاميع الأصول الوراثية – فيما يلى:

أ – وصف العشيرة أو الصنف.

ب – تحديد الاختلافات الوراثية بين الأفراد أو الأصناف.

جـ – تحديد العلاقة والقرابة الوراثية phylogenetic relationships داخل النوع

د – تحليل مسارات الهجرة للنوع من مراكز النشؤ.