

## الواسمات والمؤشرات الجزيئية

### مميزات الهندسة الوراثية

- السرعة في نقل المورثات من كائن حي إلى آخر وذلك بمرور أسابيع قليلة ومحددة بدلاً من الطريقة التقليدية والسائدة والمتعارف عليها في تغيير التركيب المورثي وباستعمال التهجين والتربية والتي تحتاج إلى سنوات طويلة.
- نقل المورثات بطرق مباشرة ومضمونة النتائج بحيث لا تسمح بنقل المورثات غير المرغوبة التي قد تكون مرتبطة : بالكروموسوم (الصبغي) والتي قد تنتقل بالطرق التقليدية مسببة لأهم مشاكل وعيوب طريقة التهجين والتربية العادية.
- نقل المورثات بواسطة الهندسة الوراثية قضى على البعد النوعي بين الكائنات الحية، حيث يمكن نقل صفة مرغوبة من بكتريا إلى إنسان أو نبات (قمح) مثلاً أو العكس، خلاف ما هو متبع بالطرق التقليدية.
- نقل مورثات خالية من الأمراض وذات صفات وراثية مرغوبة إلى كائنات حية جديدة تنقصها هذه الصفات.

### الواسمات الجزيئية

توفر الواسمات الجزيئية تقنية مفيدة للغاية للمحافظة على المصادر الوراثية للكائنات الحية واستخدامها، كما تسهل تحليل ومراقبة التنوع الحيوي، وتقييم وتحديد ميزات وخصائص المورثات التي تم جمعها، وكذلك تقييم التنوع في المجموعات الحيوية المتوفرة، ومن المزايا الأخرى لهذه التقنية أنها :

1. تمثل فرصة لا مثيل لها لتوفير المعلومات حول التنوع الذي يوجد لبعض الأنواع الخاصة ضمن الأقاليم المحلية وبين البلدان، وكذلك حدود الثبات الوراثي للأجيال المنتجة من الجنس أو النوع الواحد.
  2. توفر دقة متناهية وطريقة موضوعية. في تحديد ماهية تنوع الأصول الوراثية، ويعد هذا مفيداً على الأخص في نشر المعلومات الدقيقة بين الشبكات الإقليمية والعالمية.
- لذا تأتي أهمية تقنيات الفصل الجزيئي للمورثات مثل (RFLP, RAPD, AFLP, VNTR)، والتي تعد بمثابة ثورة في الوصول إلى الهدف المتضمن مراقبة التنوع الحيوي والوراثي.
- نظراً لحدوث الانجراف الوراثي وفقدان التنوع الوراثي والقاعدة الوراثية للأنواع الحية فقد تم إنشاء بنوك وراثية لحفظ الأصول الوراثية ساعدت في تجميع عدد كبير من المدخلات مما أدى إلى ظهور مشكلات جديدة تتجلى في صعوبة إدارة هذه البنوك واستحالة حفظ كل التراكيب الوراثية خاصة أن هذا العدد الكبير لا يمثل بالضرورة طرزاً وراثية متباينة ، وأن هناك نسبة عالية من المدخلات ذات التركيب الوراثي المتماثل .
- وبغية زيادة فاعلية برامج الأصول الوراثية وكفاءة البنوك الوراثية كان لابد من إيجاد وسيلة لتخفيض عدد المدخلات المتكررة عن طريق ما يسمى بالمجموعات المحورية
- وهي مجموعة من المدخلات الوراثية المنتخبة من المجموعات Core Collection الأساسية الموجودة في البنك الوراثي وتشمل جميع العينات الوراثية الموجودة في المجموعة التي انتخبت منها مع أقل نسبة من التكرارات .
- ولكي تؤدي هذه المجموعة المحورية دورها بشكل فاعل لابد التعرف عليها و توصيفها و تقييمها بطرق عديدة .

تم في البدء استخدام المواصفات المورفولوجية ، إلا أن دراسة الاختلافات بين الأفراد والمعتمدة على دراسات الكائنات على مستوى الصفات الشكلية و الخصائص الفيزيولوجية وكذلك الخصائص الشكلية المظهرية تعد محدودة الإمكانيات وصعبة القياس ، وبالتالي لا يمكن الاعتماد عليها بشكل كامل في تحديد الاختلافات ودراسات درجات القرابة الوراثية بين الأفراد في تحديد الاختلافات بين نظائر الموقع الواحد

### 1- أهمية المؤشرات الجزيئية :

رغم أهمية الصفات الشكلية و الخصائص الفيزيولوجية وكذلك الخصائص الشكلية المظهرية إلا أن الحاجة للمؤشرات الجزيئية أصبحت أكثر أهمية وإلحاحاً ويرجع ذلك للأسباب التالية:

1- توفر المؤشرات الجزيئية نتائج مبكرة مما يساعد في الإسراع بعمليات الانتخاب والتربية وبذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه إضافة إلى خفض كلفة المادة التي تحتاجها الدراسات المورفولوجية.

2- عدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والمؤشرات الجزيئية وبالتالي يمكن استخلاص المادة الوراثية من الـ DNA من المراحل الأولى للنبات.

3- سهولة تحديد موقع وراثي مطلوب لطرز وراثي معين Geno type مباشرة.

4- عدم تأثر المؤشرات بالشكل الظاهري للكائن الحي والمؤشرات البيئية كما في برامج التربية التقليدية.

5- الحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً.

6- إن جوهر العمل التربوي يكمن في تربية السلالة المتفوقة أو الطراز الوراثي المفضل فيه في البيئة حيث تسمح له بالتعبير عن إمكاناته الإنتاجية الكامنة وبما أن تطوير هذا الطراز يعتمد على نقل المورثات المتحكم بالصفة المطلوبة للوصول إلى أصناف جديدة أفضل وبالتالي فإن معرفة مواقع هذه المورثات في الكائن الحي المانح ضرورية لتسريع برنامج العمل التربوي.

إن الاستخدام الرئيسي للمؤشرات الجزيئية هو في الوصول إلى مواقع المورثات المطلوبة بأقرب مسافة وراثية ممكنة لأنه كلما تم التوصل إلى مؤشر جزيئي قريب من المورث كلما كانت احتمالية ارتباطه به أعلى فإذا كانت الصفة نوعية **Qualitative trait** ويتحكم بها مورث واحد أو زوج من المورثات فيكتفى بالاعتماد على هذا الارتباط بين مؤشر ومورث أما إذا كانت الصفة كمية **Quantitative trait** ويتحكم بها أكثر من مورثتين فيجب دراسة توزع المؤشرات الجزيئية لهذه المورثات وربطها مع الأداء البيئي لهذه الصفة للمساعدة في استخدامها في عمليات الانتخاب والتربية والتحسين وغرلة الطرز والأصناف والسلالات بوقت مبكر.

### صفات المؤشر الوراثي المثالي:

يعتبر المؤشر الوراثي مثالياً عند تمتعه بالصفات التالية :

1- ليس له أثر على الشكل الظاهري

2- يظهر تعبيراً متساوي السيادة

3- يظهر بشكل نسخة واحدة

4- اقتصادي

5- يظهر تعدديات شكلية كثيرة

- 6- يمكن تقديره بسهولة
- 7- ذو وظائف عديدة
- 8- يتوفر بسهولة لمن يريد العمل عليه
- 9- ذو تخصصية بالنسبة للجينوم وخاصة عند العمل على ال (polyploidy)
- 10- إمكانية الأتمتة

### كيفية اختيار المؤشر الوراثي:

يعتمد اختيار المؤشر الوراثي على :

1. أهداف المشروع.
2. بنية المجموع الوراثي.
3. التنوع الوراثي لجينوم النوع المدروس.
4. توفر نظام المؤشر الوراثي.
5. توفر الوقت المتاح للتحليل.
6. كلفة وحدة المعلومة.

### أنماط المؤشرات الوراثية:

#### المؤشرات الشكلية:

يمكن أن تستخدم الصفات الشكلية المسؤول عنها موقع وراثي واحد كمؤشرات وراثية إذا كان تعبيرها ثابتاً في مدى واسع من البيئات. ولكن غالباً ما تتأثر المؤشرات الشكلية بالعوامل البيئية والوراثية. بالتالي فإن وصف مثل هذه الصفة له معنى فقط عندما تتوفر معلومات موثقة عن النسب والظروف البيئية. وبما أن هذه العوامل تستطيع أن تعدل تعبير المورثة فإن ذلك يحد من استخدامها كمؤشر وراثي.

#### مؤشرات جزيئية تعتمد على الـ PCR :

كان لتطوير تقانة التفاعل السلسلي البوليميري ( PCR ) Polymerase Chain Reaction من قبل واكتشاف أنزيم DNA-polymerase الأثر المهم على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية ، حيث اعتبر هذا الإنجاز تطوراً هاماً خاصة عندما أمكن تضخيم Amplification (مضاعفة ) قطع محددة من الـ DNA باستخدام بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف. إن إيجاد تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز الـ (PCR) لتضخيم قطع صغيرة من الدنا فسح المجال أمام جيل ثان من المؤشرات الذي كان أسرع وأقل تكلفة ويحب أن يكون واضحاً أن هذه التقانة في تطور مستمر حيث يظهر دائماً أنظمة أحدث في البحث المستمر عن مؤشرات أكثر اقتصادية بين أيدي مربي النبات أو الحيوان في القرن الحادي والعشرين .

ومن أهم المؤشرات الجزيئية التي تعتمد على الـ PCR والمستخدم لدينا حالياً نذكر :  
أ- تقانة المكاثرة العشوائية ذات التعدد الشكلي للـ DNA ( PCR-RAPD )

### Randomly Amplified Polymorphism DNA

#### تقانة الـ Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

تعتمد هذه التقانة على إكثار كسرات الدنا المتباينة في تسلسلها النيكلوتيدية عشوائياً حيث تضخم كسرات الدنا الحاوية على تتاليات نيكلوتيدية، والتي يمكنها أن تشكل تتامية مع البادئات العشوائية من نهايتها، يمكن رؤيتها على شكل عصابات bands مختلفة الوزن الجزيئي في هلامة من الآغاروز.

من ميزات هذه التقانة:

- إمكانية أتمتها
- توفر عدد كبير جداً من البادئات التي يمكن تبادلها بين مراكز البحث،
- إضافة إلى سهولة معرفة التسلسل النيكلوتيدي للبادئ،
- بينما يعاب عليها في أنها تستخدم بادئات لا يزيد طولها عن 10 زوج نيكلوتيدي يمكنها أن تلتصق بمواقع متعددة من الجينوم، مما يسمح بالكشف عن المؤشرات الجزيئية ذات السيادة التامة *dominantly inherited* فقط.
- إضافة إلى كونها لا تتمتع بثقة الباحثين لعدم ثباتية النتائج عند تكرارها.
- لا تحتاج إلى كمية كبيرة من الدنا الجينومي *genomic DNA*.
- إضافة إلى أنها تتطلب خبرة عملية دقيقة وتحتاج إلى زمن طويل لإجرائها. كما أن اعتمادها على المسابر الموسومة إشعاعياً بـ  $P^{32}$  أو  $P^{33}$  يعد عاملاً محدداً لاستخدامها في كثير من المخابر في الدول النامية.

#### ب- تقانة التتابع البسيطة الترادفية ( SSR ) Simple Sequence Repeats :

كما أطلق عليها الميكروساتالايت *Microsatellite markers* أو

#### ( STMS ) ( Sequence Tagged Microsatellite Repeats ) :

وهي عبارة عن تسلسلات متكررة تتكون من أربع وحدات هي القواعد الأساسية للـ DNA وهي الأدينين ( A ) والسيتوزين ( C ) والجوانين ( G ) والثيامين ( T ) والمؤلفة من 1-6 أزواج نيوكليوتيدية تتوالى مراراً وتكراراً من طرفيها ويحاط التابع الترادفي البسيط بتتالي نيوكليوتيدي ثابت ووحيد في تواجده في مورثات النوع الواحد .  
يتميز الـ DNA في الكائنات الراقية بأنه مكون من 3 أنواع من المقاطع:

1 - مقاطع وحيدة النسخة.

2- مقاطع متوسطة التكرار

3- مقاطع كثيرة التكرار ومنها مقاطع الوحدات القصيرة المتكررة (Microsatellites) .

تعتبر هذه التقانة مثالية وهامة بسبب وفرتها وتواجدها على كامل المورث وتوزعها بشكل منتظم أو شبه منتظم ، وتتطلب كمية قليلة من المادة الوراثية DNA وثابتة النتائج عند تكرارها ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بمجرد معرفة التسلسل النيوكليوتيدي لها .

ويؤخذ عليها حاجتها إلى بادئات ذات تسلسل نيوكليوتيدي محدد يحدد مكان التابع البسيط الترادفي SSR .

## تقانة التتابع البسيطة الترادفية (SSR) Simple Sequence Repeats

تعتبر مؤشرات الـ SSR مؤشرات نوعية متخصصة، حيث يتم استخلاصها من DNA الكائن مباشرة وتستخدم لدراسة نفس الموقع عند أفراد أخرى تابعة لنفس النوع. تعد هذه التقانة هامة بسبب ارتفاع معدل تطهيرها، حيث أن كسب أو فقد تكرار واحد بين جيل وآخر، يفوق عشرة آلاف مرة احتمال حدوث طفرة تصيب قاعدة أزوتية واحدة في مورثة ما في الحالات العادية. يوجد في مناطق الـ DNA المتكررة انواع مختلفة من الوحدات القصيرة المتكررة والتي يتراوح عدد النيوكليوتيدات المكون لكل منها من 1-6 أزواج من النيوكليوتيدات وتتواجد على مناطق مختلفة ومتعددة من الجين .

(A)<sub>10</sub> = AAAAAAAAAA

(AT)<sub>10</sub> = ATATATATATATATATATAT

(ATT)<sub>10</sub> = ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT

(GATA)<sub>7</sub> = GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATA

(GACTA)<sub>6</sub> = GACTA GACTA GACTA GACTA GACTA GACTA

يحيط بهذه الوحدات مقاطع طويلة وحيدة النسخ تتواجد مرة واحدة على الجين.

GCTGACTACGTTAG ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT CGTACAT

TGGACGCAGTACG ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT

GCTGATGA CGTTAAGCAGAGCAGCTAGTGTACAC

TACTGCATGACGTACTAGCA TGA CACT AGGACA GATA GATA GATA

GATA GATA GATA GATA GATAGA A G GCACGCG TAGCT

GGCCAGTATAGGACTGACGTAAC CGCTAGCACTGA.

كما أن لهذه التتابع البسيطة الترادفية الدناوية (SSRs) إمكانية الكشف عن التتاليات النيكلوتيدية ذات السيادة المشتركة في التوريث، فقد استخدم التتابع البسيطة الترادفية الدناوية (SSRs) لإنشاء خريطة ارتباط وراثية للعشب *Arabidopsis thaliana* ، و في رسم خرائط الارتباط الوراثية في الشعير .

وتعد التتابع الترادفية (SSR) مؤشرات جزيئية مثالية للأسباب التالية:

- وفرتها وتواجدها على كل أجزاء الجينومات وتوزعها بشكل منتظم أو شبه منتظم في الجينومات كافة.
- كما أن ارتفاع معدل تطهيرها يعكس نسب عالية في التباينات الشكلية،
- أضف إلى أن نتائجها ثابتة عند تكرارها ويمكن استخدامها في الكشف عن السيادة المشتركة المندلية (Codominant) في التوريث.
- كما أنها تتطلب كمية قليلة من الدنا DNA ،

- ويمكن أتممتها automation حيث أنه يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكلوتيدي لها،  
و تصبح من أفضل التقانات الحيوية للحصول على المؤشرات الجزيئية الـ DNA في رسم خرائط الارتباط الوراثية.

إلا أنه يعاب عليها في أنها تحتاج إلى بادئات ذات تسلسل نكلوتيدي محدد يحدد مكان التابع البسيط الترادفي SSR.

### هناك شروط لاختيار وتصميم البادئات:

- ان تتكون من 18-25 نيوكليوتيد

- ان تكون متقاربة بالعدد والتركيب النيوكليوتيدي من حيث محتواها من الادنين والتيامين والسيتوزين  
والجوانين.

- ان لا يكون تركيبها النيوكليوتيدي مكمل لبعضها البعض.

- ان تكون أقرب ما يمكن لمقاطع المايكروساتولايت.

- أن تتراوح القطع المرغوب مكائرتها بين 100-300 bp .