جامعة سوهاج
كلية الزراعة
قسم المحاصيل

محاضرة رقم (٦)

الاتجاهات حديثة في تربية النبات

لطلاب المستوي الرابع برنامج الانتاج النباتي (محاصيل و بساتين)

اعداد

دكتور/ إسماعيل محمود احمد بديوي

استاذ مساعد تربية المحاصيل

لمزيد من المعلومات يرجي التواصل عبر البريد الالكتروني

ismail_bedawy@yahoo.com

Genetic marker الواسم الوراثي

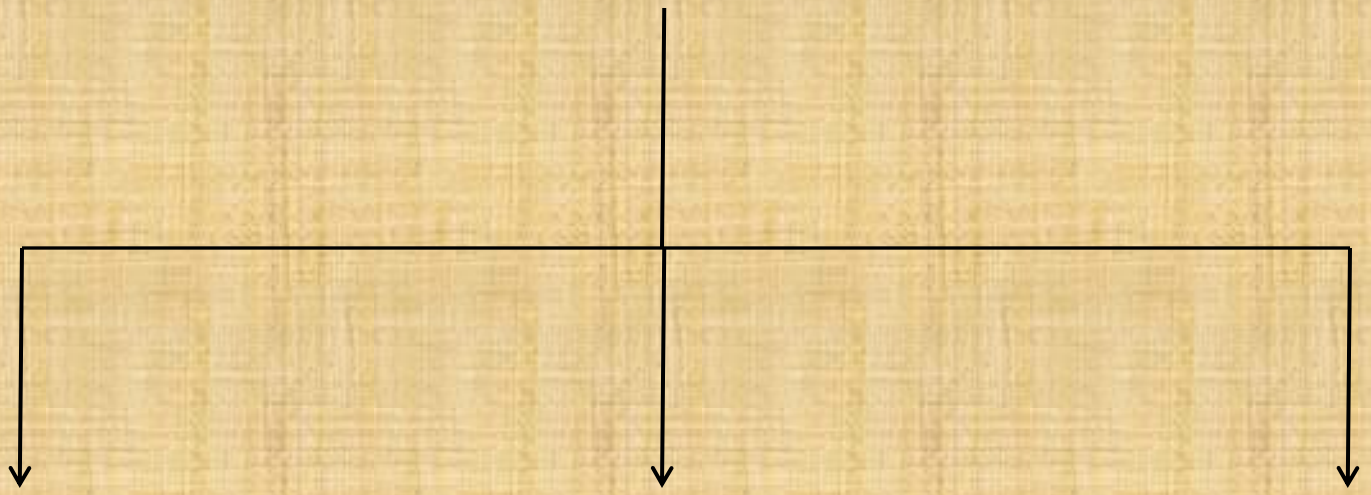
يقصد بالواسم الوراثي اختلاف في موقع من DNA- genome يمكن وراثته ويسهل الكشف عنه كما يمكن متابعته عبر الأجيال

بمعنى اخر هو صفة معينة (عادة تكون سهلة الملاحظة أو الكشف عنها)، تستخدم في الدراسات الوراثية.

لذلك يعتبر الواسم الوراثي ذو أهمية كبيرة في برامج البحوث وبرامج التربية العملية لأنها تعكس التغيرات الوراثية في العينات

ويوجد ثلاثة أنواع من الواسمات الوراثية استخدمت في الدراسات الوراثية:

Genetic Markers



الواسمات المظهرية
Morphological markers

الواسمات الكيموحيوية
Biochemical markers

الواسمات الجزيئية
Molecular markers

١- الواسمات المظهرية Morphological markers

خصائص (صفات) وراثية تحدث على مستوى المورثات يمكن مشاهدتها من خلال اختلاف في اللون أو الشكل وقد شاع استخدامها في الدراسات الوراثية مبكرا في القرن العشرين.

مثل الاختلاف في لون الازهار بين التراكيب الوراثية (قانون مندل الاول والثاني).

٢-الواسمات الكيموحيوية Biochemical markers

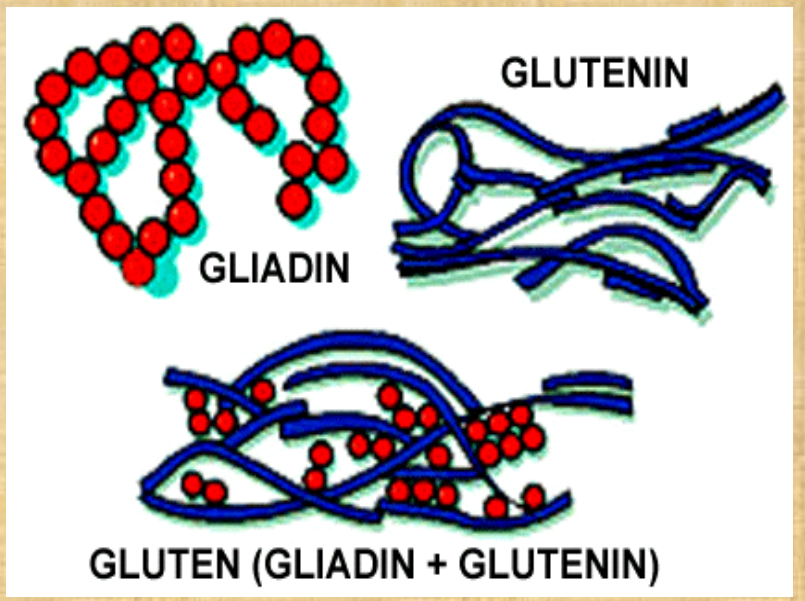
قدم التطور الذي حدث عام 1960 في تقنيات الفصل الكهربائي بديلا واعدا للواسمات المظهرية عرف بالواسمات الكيموحيوية ويشمل واسمات النظائر الأنزيمية Isoenzyme markers وأنماط الحزم البروتينية Total protein patrons

وقد تميزت هذه الواسمات بما توفره من بيانات وراثية تعكس الاختلافات بين الأنواع وضمن الأنواع وتميزت أيضا بإمكانية استخدامها كأداة لقياس هذه الاختلافات ذلك أنها عموما تعكس الوراثة المندلية Mendelian inheritance،

كما انه بالإمكان تمييز الافراد الهجينة (متباينة الزيجوت Heterozygotes) من الافراد النقية (متماثلة الزيجوت Homozygotes) .

Biochemical (protein) Markers

Allozymes:
Isoenzymes of protein nature whose synthesis is usually controlled by codominant alleles and inherited by monogenic ratios



Isozymes:

A species of enzyme that exists into two or more structural forms which are easily identified by their activities

٣- الواسمات الجزيئية Molecular markers

ويقصد بها DNA markers ذلك إن الـ DNA تعد الأداة الأساسية في هذه التقنية وقد تميزت بكونها أداة مناسبة للتحليل الوراثي حيث انها عالية الدقة وموفرة الوقت مما جعلها تقنية واعدة لمربي النبات وعلماء الوراثة في مجالات عديدة كتميز الأنواع وتحديد البصمة الوراثية والعلاقات الوراثية والتطورية بين الأنواع وإعداد الخرائط الوراثية . وهذا النوع يظهر الاختلافات في مواقع DNA وتستخدم حاليا علي نطاق واسع.

وهي تنشأ من طفرات في DNA مثل طفرات الاستبدال واعادة الترتيب أو اخطاء في النسخ المتكرر. وهي اختيارية بطبيعتها وذلك لانها تقع في المناطق الغير مشفرة ولا تتاثر بعوامل البيئة أو مرحلة نمو النبات عكس باقي الانواع من الماركرز.

شروط عمل DNA Markers

١- حجم العشيرة (تحتوي علي الاقل علي ٥٠ تركيب وراثي يستحب الاكثر من ١٠٠ تركيب)

٢- نوع العشيرة (ذاتية التلقيح – خلطية التلقيح)

٣- وجود اختلافات وراثية

٤- نوع الماركرز نفسه Dominant , Co-dominant

وتنتظم معظم الواسمات الجزيئية ضمن ثلاث مجموعات وهي كالآتي:

DNA Marker (Molecular marker)

1. Hybridization molecular based markers
2. PCR molecular based markers

Hybridization based markers

Examine differences in size of specific DNA restriction fragments

Require pure, high molecular weight DNA and probe

Usually performed on total cellular genome

أولا: تقنيات تقوم على التهجين Hybridization based (non PCR technique)

منها تقنية Restriction fragment length polymorphism (RFLP)،

وهي أول تقنية استخدمت في هذا المجال ولا تزال من أكثر التقنيات استخداما في تقدير التنوع الوراثي في الأنواع النباتية وتستخدم عندما يكون عدد العينات التي يتم تحليلها قليلة وكذلك إمكانية مشاهدة الاليلات مباشرة.

تعتمد هذة الطريقة علي مقارنة احجام مختلفة داخل الجينوم للكائن الحي وللحصول علي هذة القطع المحددة تستخدم انزيمات القطع Restriction Enzymes وعند المقارنة بين اكثر من سلالة لنوع واحد تستخدم انزيم قطع معين فيعطي اطوال مختلفة داخل كل سلالة فنستطيع المقارنة بين كل سلالة واخري

مميزاتها:

١-تتميز بكونها تقنية بسيطة وسهلة وبعدم حاجتها الى معلومات مسبقة عن تتابع الـDNA

٢-له تعدد اشكال عالي Highly polymorphism

٣-يستخدم بكفاءة في عمل البصمة الوراثية

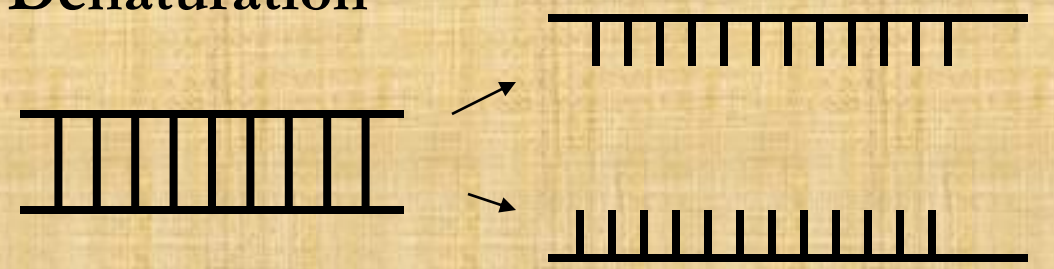
عيوبها:

١- تحتاج الى كمية كبيرة من الـDNA عالي النقاوة ويعد انجازها آليا غير سهل.

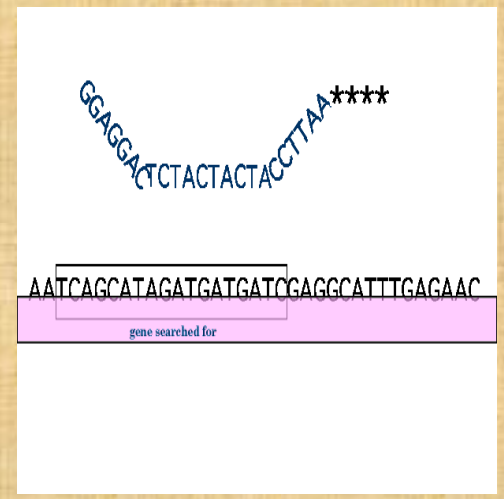
٢- تستغرق وقت طويل ومكلفة من ناحية العمالة والمواد **ومنها ايضا DArT**

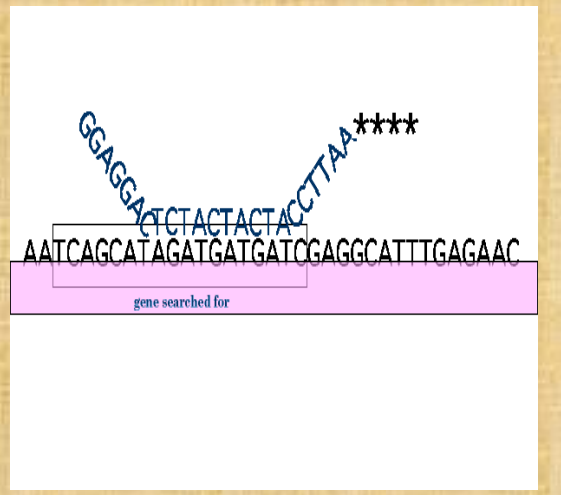
DNA/DNA Hybridization

Denaturation

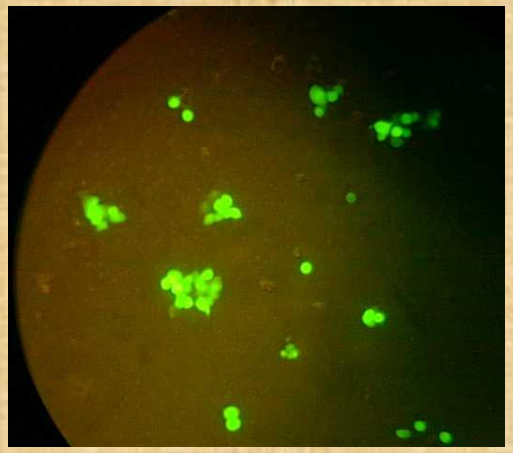


Elevated temperature





Known DNA sequence



Restriction Fragment Length Polymorphism

RFLP techniques

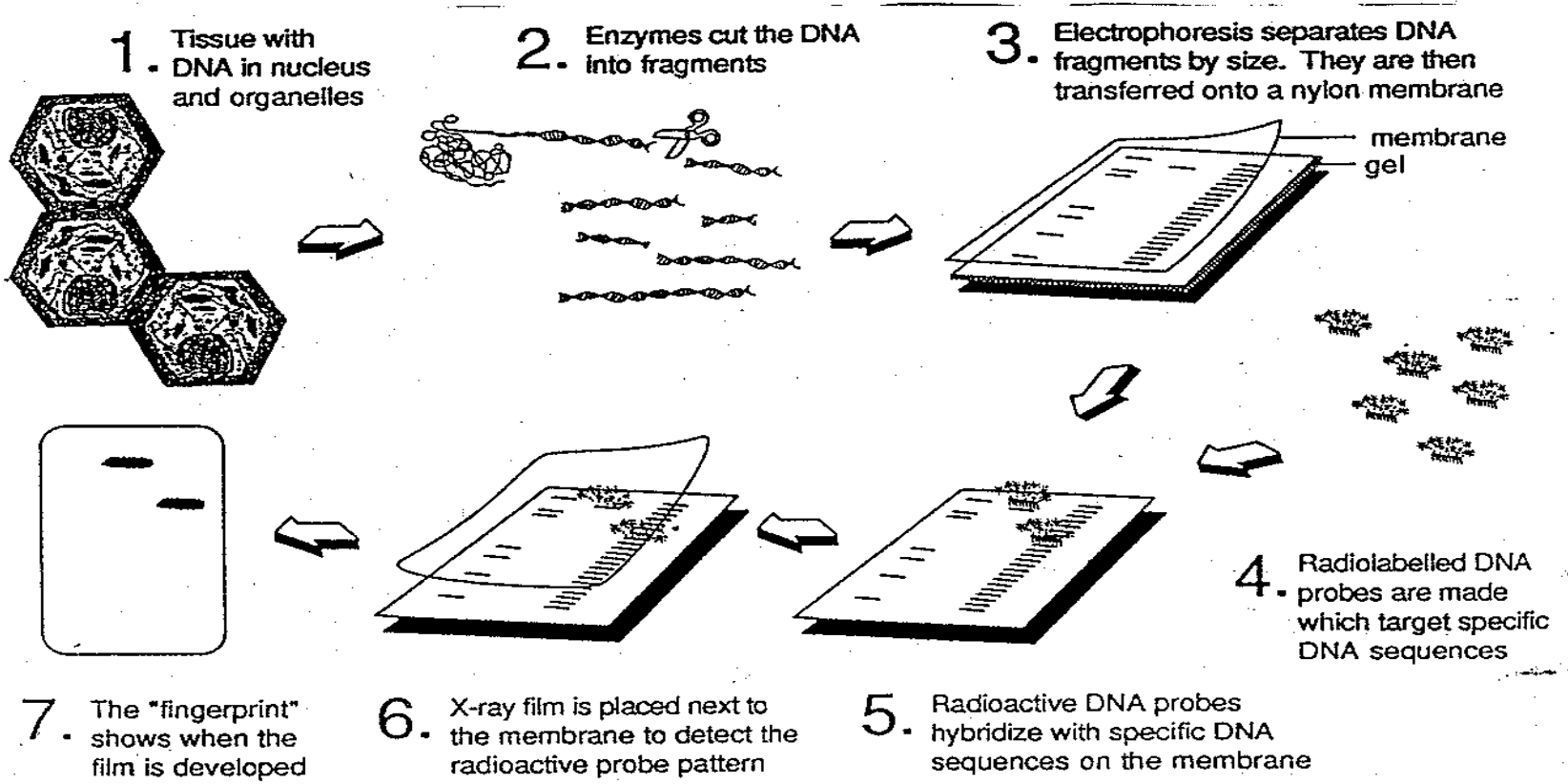


Figure 1. Schematic representation of DNA isolation, restriction nuclease digestion, electrophoresis, and Southern hybridization.

DNA fingerprinting- The powerful new tool for the Genetic Detective. 1990. Peter M. Gresshoff *et al.* Tennessee Farm and Home Science.

٢- تقنيات تقوم على بادئات عشوائية Arbitrary-primed PCR techniques

واستخدام تقنية تفاعل سلسة البوليمرات Polymerase chain reaction (PCR) وهي تقنية تؤدي الى تكرار قطعة من الـDNA ملايين المرات وبسرعة، وهذه التقنية أزالت الحاجة الى خطوة التهجين المستخدمة في التقنية السابقة ومثال على ذلك:

أ- تقنية Random amplified polymorphic DNA (RAPD)،

ويتم الحصول على الواسم الوراثي من خلال تضخيم قطعة من الـ DNA باستخدام تقنية PCR وذلك بواسطة بادئاتPrimersعشوائية (١٠ قواعد نيتروجينية وتكون تحتوي علي الاقل علي ٦٠% من G, C) حيث تلتحم في عدة مواقع بصورة عشوائية ثم تعزل القطع على الهلام بواسطة الفصل الكهربائي ويحدث التعدد الشكلي Polymorphism نتيجة تغير مكان ارتباط البادئ على الـDNA

مميزاتها:

١-تتميز هذه التقنية بسهولتها وسرعتها ٢- احتياجها لكمية قليلة من الـDNA

٣- بعدم حاجتها الى معلومات مسبقة عن تتابع الـDNA ويستخدم فيها بادئات مناسبة لأي DNA

٤-كما تتميز بعدم استخدام أي مواد مشعة وتعتبر غير مكلفة و يمكن انجازها آليا

عيوبها

١- عشوائية غير متخصصة ٢- Dominant Markers

٣- يعاب عليها ضعف دقة الإنتاجية والنتائج احيانا تكون غير دقيقة.

RAPD Polymorphisms among landraces of sorghum

استخدام تقنية RAPD في التفرقة بين ١٠ تراكيب من الذرة الرفيعة

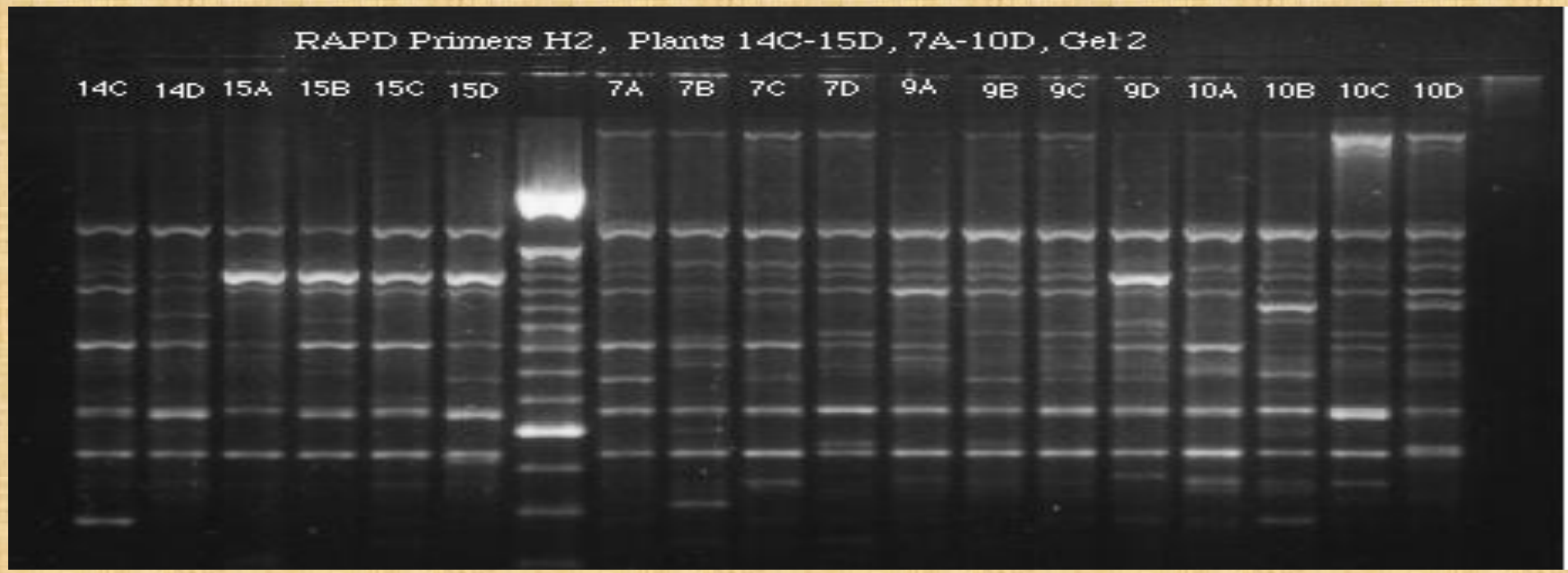
Sequences of 10-mer RAPD primers

تتابعات برايمرز من تتكون من ١٠ قواعد نيتروجينية

Name اسم البرايمر	Sequence التتابع
OP A08	5’ –GTGACGTAGG- 3’
OP A15	5’ –TTCCGAACCC- 3’
OP A 17	5’ –GACCGCTTGT- 3’
OP A19	5’ –CAAACGTCGG- 3’
OP D02	5’ –GGACCCAACC- 3’

RAPD gel configuration

صورة الجل ل DNA الناتج من تفاعل RAPD لعدد ١٠ تراكيب وراثية مختلفة من الذرة الرفيعة



تقنيات تستهدف تتابع في موضع واحد بالتضخيم باستخدام تقنية الـPCR:

وتستهدف هذه التقنية بالتضخيم تتابعات قصيرة من 12-2 مترادفة منتشرة عبر الـ DNA بكاملة مثال ذلك :

أ- **تقنية Simple sequence repeats (SSRs)،**

مؤشرات المقاطع البسيطة المتكررة (SSR)عبارة عن وحدات من شريط الـ DNA بها نيكلوتيدات قصيرة جداً ، تسمى وحدات متكررة، تتكون من عدد من أزواج النيوكليوتيدات يتراوح بين (1-6)، هذه الوحدات المتكررة تتواجد بكثرة في جينات حقيقيات النواة وتتوزع على جميع الصبغيات سواء في المنـاطق المشفرة أو غير المشفرة .

وتتطلب طريقة الـ SSR استخلاص الـ DNA وتضخيم أجزاء أو كسر منة Fragments بواسطة تقنية الـ PCR ثم فصل نواتج التعدد الشكلي Polymorphismsبالفصل الكهربائي على هلام البولي أكريلاميد أو الاجاروز، ثم أظهار التعدد الشكلي باستخدامAutoradiogrphy وصبغة الفضة Silver Staining وضوء الفلورسنت عند استخدام البولي أكريلاميد ، أما إذا استخدم الاجاروس فتستخدم صبغة الايثيديوم بروماید وتظهر بالأشعة فوق البنفسجية (Karp *et al.,* 1997).

SSR (Simple sequence repeat)

DNA markers which developed by amplifying microsatellite in the genome

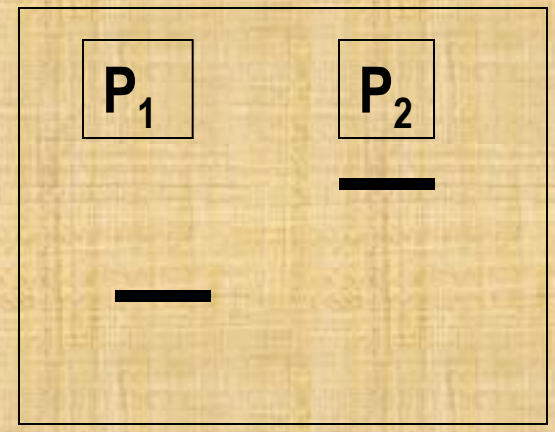
Sequence	Primer
ACTGTCG**ACACACACACACAC**GCTAGCT TGACAGC**TGTGTGTGTGTGTG**CGATCGA	$(AC)_7$
ACTGTCG**ACACACACACACACAC**GCTAGCT TGACAGC**TGTGTGTGTGTGTGTG**CGATCGA	$(AC)_8$
ACTGTCG**ACACACACACACACACACAC**GCTAGCT TGACAGC**TGTGTGTGTGTGTGTGTGTG**CGATCGA	$(AC)_{10}$
ACTGTCG**ACACACACACACACACACACACAC**GCTAGCT TGACAGC**TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG**CGATCGA	$(AC)_{12}$

SSR polymorphisms

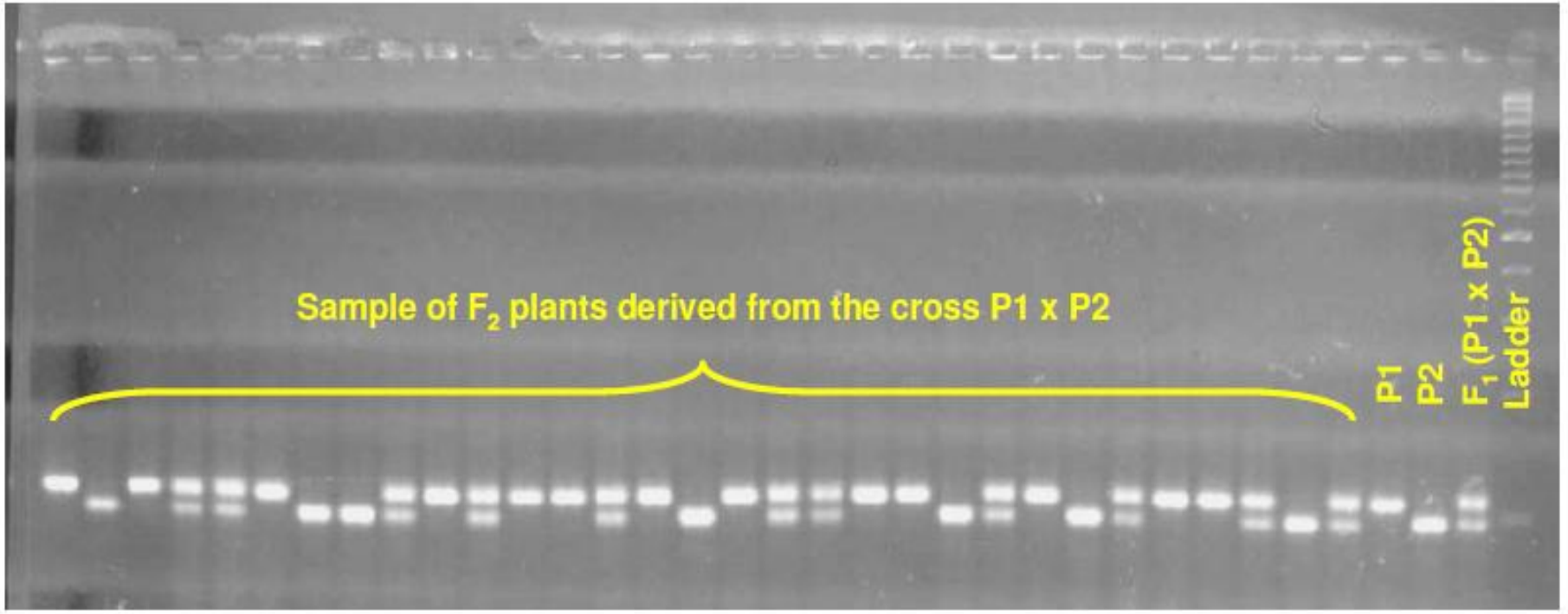
P_1 AATCCGGACTAGCTTCTTCTTCTTCTTCTTTAGCGAATTAGG

P_2 AAGGTTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTAGGCTAGGCG

Gel configuration



Example of application of SSR marker



High concentration (3%) gel electrophoresis.

Marker umc1001. Maize.

استخدمت (SSR Markers) في العديد من الدراسات ذات الأهداف المختلفة مثل إنشاء خرائط الارتباط الوراثية لعدد من الصفات الهامة ولأنواع نباتية مختلفة وفي دراسة التنوع الوراثي (Struss and Plieske, 1998; Choumane *et al*., 2000; Khlestkina *et al*., 2004; Ozkan *et al*., 2005; Ordon*et al*., 2005)

وكذلك في التمييز بين الأنواع وتوضيح العلاقات التطورية و تصنيف المجموعات الوراثية (Feng *et al.* 2006; Choumane *et al.,* 2000; Matus and Hayes, 2002). واستخدمت طريقة SSR على نبات العنب *Vitis vinifera* (Bowers *et al.,* 1996; Thomas and Scott , 1993; Bowers *et al.,*1999)

وللتعرف على أصناف العنب (Bowers and Meredith, 1997) والبحث عن أصول أصنافه (Bowers *et al.,* 1999) ، وعمل خرائط وراثية لمورثاته (Riaz and Meredith , 2000) ووضع صفات وراثية للـ Germplasm لنبات العنب (Lamboy and Alpha , 1998).

واستخدمت ايضا في عمل الخرائط الوراثية لنباتات الشعير- القمح – الكانولا وكذلك لتحديد المواقع الوراثية المسئولة عن الصفات الكمية في تلك المحاصي

مميزاتها:

١- طريقة الـ SSR تحتاج إلى كمية قليلة من الـDNA Template DNA في حدود (١٠ -١٠٠ نانوجرام) (10-100 ng per reaction)

٢-الحصول على تعدد شكلي ذو مستوى عالي (Jones *et al.*, 1997 ; Karp *et al.*, 1997)

٣- بالإضافة إلى أنها عالية التكرر ونتائجها متطابقة High Reproducibility ، ولها تطبيقات واسعة في عدة مجالات.

٤- تتميز هذه المؤشرات بارتفاع مستوى التباينات polymorphism التي تكشفها مقارنة بعدد من التقنيات الأخرى وكذلك بسهولة تطبيقها و تحليل نتائجها.

٥- Co-dominant markers

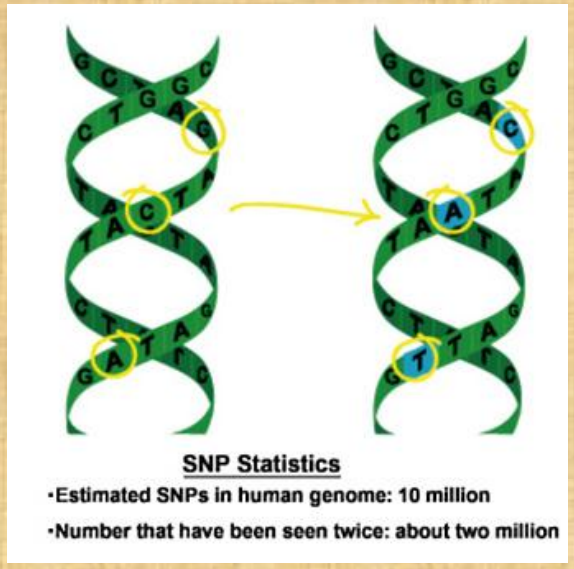
عيوبها:

تكلفتها العالية ، كذلك الـ Heterozygotes فقد تصنف خطأ على أنها Homozygotes عندما تظهر الـ Null-alleles نتيجة طفرة في موقع البادئ.

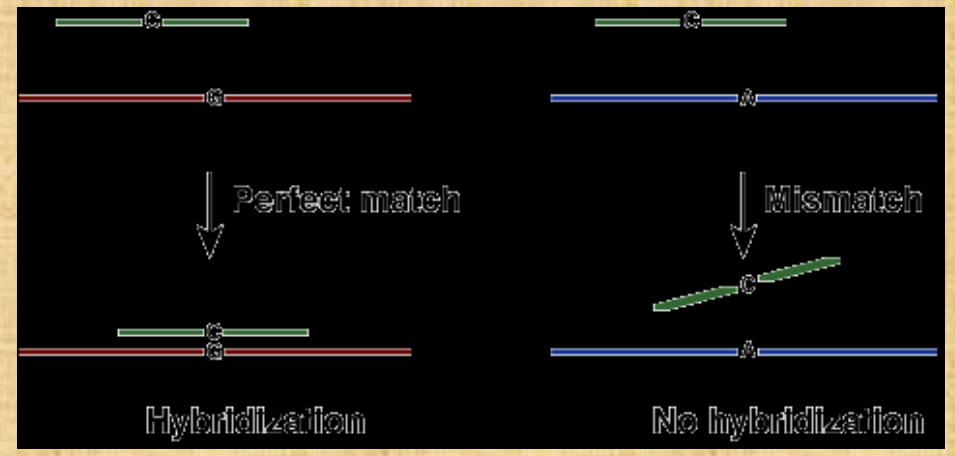
SNPs
(Single Nucleotide Polymorphisms)

DNA markers which their polymorphism can be determined by single nucleotide difference

SNPs on a DNA strand



Hybridization using fluorescent dyes



✓Any two unrelated individuals differ by one base pair every 1,000 or so, referred to as SNPs.

✓Many SNPs have no effect on cell function and therefore can be used as molecular markers.

SNPs
(Single Nucleotide Polymorphisms)

- هو الاختلاف بين الافراد او التراكيب الوراثية في قاعدة نيتروجينية واحدة فقط
- هو افضل انواع الماركرز وذلك لانه يوضح الاختلاف علي المستوي الدقيق من القواعد النيتروجينية الذي يصل الي قاعدة واحدة فقط
- اذا كان فردين يختلفا في زوج واحد فقط من القواعد النيتروجينة فكيف يكون الحال علي مستوي اكثر من ١٠٠ فرد فنحصل علي عدد كبير من الاختلافات داخل العشيرة
- بالرغم من ان الاختلاف بين الافراد في قاعدة نيتروجينية واحدة لا يغير من وظيفة الخلية الا انه يستخدم للتفرقة بين التراكيب الوراثية بدقة عالية جدا
- تمكن (**Bedawy *et al.*, 2018**)من التفرقة بين عدد ٥٠ تركيب وراثي من الشعير البري والمنزرع باستخدام ٥٨٩٢ SNPs marker مع العلم ان الشعير يحتوي علي ٧ كروموسومات فقط.

مميزاته:

١- عالي الدقة ٢- اكثر الواسمات دقة في تحديد الاختلافات بين الافراد

٢- Co-dominant markers

عيوبه:

١- ارتفاع تكاليفه

جدول 1. مقارنة بين بعض واسمات الـDNA الشائعة الاستخدام

ت	المعالم	RFLP	RAPD	SSR	SINP
1	كمية الـDNA اللازمة (µg)	10	0.02	0.05	0.05
2	مواصفات الـDNA	عالية	عالية	متوسط	عالية
3	المعتمدة على تقنية PCR	لاتعمد	تعمد	تعمد	تعمد
5	مرونة الاستخدام	غير مرنة	مرنة	مرنة	مرنة
6	نوع السيادة	مُشتركة	سائدة	مشتركة	مشتركة
7	مرونة التشغيل الآلي	واطئة	متوسط	عالية	عالية
8	قابلية تكرار النتائج	عالية	متوسط	عالية	عالية
9	تكاليف تطويرها	واطئة	واطئة	عالية	عالية

أسس اختيار واسمات DNA

أولاً: نوع المعلومات المطلوبة ومدى قابلية الواسمات الوراثية لتحقيق هذا النوع من المعلومات. فإذا كان المطلوب معرفة العلاقة التطورية بين الأنواع المدروسة كالأنواع البرية والمنزرعة ولمعرفة التاريخ التطوري للأنواع يتم اللجوء إلى واسمات تعتمد على الكشف عن تتابعات معينة داخل الأنواع قيد الدراسة. أما إذا كان المطلوب إيجاد نوع العلاقة الوراثية بين الأفراد المدروسة فاغلب واسمات الDNA يمكن استخدامها لهذا الغرض وكذلك للتوصيف الوراثي لهجين الأفراد قيد الدراسة (Botton *et al.*, 2005).

ثانياً: نسبة التباينات الوراثية المتوقعة بين الأفراد المدروسة وهذا يعتمد على كون الدراسة تتناول العلاقة بين الأنواع أو ضمن الأصناف أو بين الأفراد التابعة للصنف الواحد. فللكشف عن العلاقات القريبة جداً بين الأنواع يتم اختيار واسمات بقوة تمييز عالية حيث وجد أن نسبة التباينات المُتوقعة بين الأنواع تعتمد على صفاتها الحيوية (حولي أو مستديم) والتوزيع الجغرافي (منتشر أو محدود الانتشار)، ونوع التلقيح (ذاتي أم خلطي) ونوع التكاثر (جنسي أم لا جنسي) إذ يمكن التكهن بدرجة عالية من التباينات الوراثية بين الأنواع خلطية التلقيح

ثالثاً: مدى توفر المجسات Probes أو البادئات Primers إذ أنّ هناك واسمات معينة تحتاج إلى بادئات متخصصة جداً كواسمات الSSR فلا يجوز اختيار هذه الواسمات لتطبيقها بدون وجود تلك البادئات في حين أن هناك مؤشرات أخرى كالRAPD أو الAP-PCR والDAF لا يحتاج إلى بادئات متخصصة ويمكن اختيارها لتطبيقها مع أي كائن.

رابعاً: هناك نقاط أخرى يجب أخذها بنظر الاعتبار عند اختيار واسم ما وهي التقيد بالوقت ومدى توفر الخبرة في تطبيق واسم معين ومدى توفر الأجهزة والمستلزمات لتنفيذ ذلك الواسم بالإضافة إلى كلفة تلك المواد.

THANKS

شكرا لكم وانتظروا محاضرة الاسبوع القادم ان شاء الله تعالي

ملحوظة هامة: لا تهتم لعبارات اللغة الانجليزية الواردة نصا في الشرح ... فهي فقط لتوضيح اكثر

تمنياتي بالتوفيق والنجاح

دكتور / إسماعيل بديوي