(تِلِنك): أحدث تقنية تجمع بين الطفرات التقليدية والجينوم الفعّالة

مدحت مجيد الساهوكي
قسم المحاصيل الحقلية
كلية الزراعة/جامعة بغداد

أيوب عبيد ألفلاحي
قسم المحاصيل الحقلية
كلية الزراعة/جامعة الانبار

المستخلص

لقد أوجدت ثورة المعلومات المتعلقة بتحديد التتابع في DNA الكائنات الحية فرصاً فريدة للكشف عن وظائف الجينات. إن الأنموذج الأول الذي تم فيه تحديد وظيفة الجينات باستخدام تحليل تتابع DNA كان يدعى الوراثة العكسية (Reverse genetic) ، بالرغم من قوة عدد من الأدوات المستخدمة في هذا المجال مثل T-DNA لتعليم الجينات وتداخل RNA ، إلا إن هذا الاستخدام له عدد من المحددات، أهمه ا عدم إمكانية استخدامه في جميع الأنواع النباتية. لقد ظهرت حديثاً تقنية (تِلِنك) (TILLING) (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) التي تتميز بالواقعية وإمكانية التطبيق بشكل واسع. تجمع هذه التقنية بين التطفير التقليدي بالمواد الكيماوية وبين البحث عن تجمعات منتجات (Polymerase Chain (PCR Reaction) تتبعها عملية عزل الاليلات الطافرة في الجينات المستهدفة. تتم مضاعفة عدد نسخ الجين بواسطة PCR، ثم يتم تجميع (Pooling) DNA الجينومي من عدة أفراد ليستخدم كقالب، تليها عمليتا فك وإعادة الحلزنة لشريط DNA الذي تمت مضاعفة عدد نسخه. إذا وجد تتابع كل من الجينوم الطافر و النوع البري في التجمع سيتشكل حينذاك شريط (Heteroduplex)، الذي يمكن التعرف عليه عن طريق شطر الجينوم وباستخدام إنزيم (Endonuclease) وتكبير القطع الناتجة على هلام تحديد التتابع. تتمتع (تِلِنك) بفائدتين كبيرتين من بين جميع أدوات الضربة القاضية (Knockout) المستخدمة للجينات النباتية: الأولى: إمكانية تطبيقها على جميع الأجناس النباتية طالما ليس هناك حاجة لنقل الجينات أو زراعة الخلية. الثاني : إنتاجها لسلسلة من الاليلات الطافرة التي من ضمنها الاليلات العالية التماثل (Hypomorphic) المفيدة في التحليل الوراثي. يمكن استخدام (تِلِنك) للبحث وللكشف عن التغاير الطبيعي في الطريقة المشتقة منها المسماة (أكوتلنك) (ECOTILLING)، التي طبقت بنجاح على الإنسان وعدد من الأنواع النباتية. كما يمكن أن تستخدم (تِلِنك) في الكشف عن تعدد أشكال النوكليتايد المفرد الطبيعي (Naturally single nucleotide (SNP's polymorphisms) ضمن الأنواع والأصناف المنزرعة والأنواع البرية. يمكن أن تعمل SNP كمعلّمات وراثية (Genetic Marker) في رسم الخرائط الوراثية وتربية وتصنيف التراكيب الوراثية . كما يمكن أن تقدم معلومات قيمة عن التركيب الجيني وحالات الارتباط وعدم التوازن فيه، فضلاً عن تركيب المجتمع والتكيف، والأخيرة صفة بالغة الأهمية لمحاصيل النباتات المختلفة.

The Iraqi Journal of Agricultural Science 40 (1) : 1-25 (2009) Elsahookie & Alfalahi

TILLING: MODERN TECHNIQUE COMBINES TRADITIONAL MUTAGENESIS AND FUNCTIONAL GENOMICS

M. M. Elsahookie
Dept. of Field Crop Sciences
College of Agric. /Univ. of Baghdad

A. O. Alfalahi
Dept. of Field Crop Sciences
College of Agric. /Univ. of Alanbar

ABSTRACT

The information revolution of DNA sequence has created a unique opportunity to investigate the function of genes. The approach that determines the function of genes first defined by DNA sequence analysis is called (Reverse Genetics=RG). The tools available for RG of plants include the use of T-DNA for gene tagging and the use of RNA interference. While these powerful methods, still have limitations, for example, they do not work in all plant species or genera. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) is reliable and widely applicable. (TILLING) combines chemical mutagenesis with mutation screens of pooled PCR products, followed by isolation of mutant alleles of the targeted genes. Genes are amplified by PCR using pooled genomic DNA from several individuals as a template. Following denaturation and renaturation of the amplified DNA, heteroduplexes form if organisms with wild type and mutant sequence are both present in the pool. The heteroduplexes can be detected by cleavage with an endonuclease and resolution of the resulting fragments on a sequencing gel. (TILLING) has two significant advantages over existing plant gene knock-out tools: first, it is applicable to any plant since it does not require transgenic or cell culture manipulations. Second, it produces an allelic series of mutations including (Hypomorphic) alleles that are useful for genetic analysis. The (TILLING) technique can be used to discover and survey natural variation. The technique is called (ECOTILLING) and has been applied to human and many plant species. (TILLING) can also be used to detect naturally occurring single nucleotide polymorphisms (SNP's) in genes among cultivars or ecotypes of any species or genera. These SNP's can serve as genetic markers in mapping, breeding and genotyping and can provide information concerning gene structure, linkage disequilibrium, population structure or adaptation. The latter, has a prime importance for all crop plants.

المقدمة

تعد الطفرة وإمكانية إحداثها احد أهم الإنجازا ت العلمية في تاريخ علم الوراثة [58,41]. حدث تقدم كبير في فهم وراثة الكائنات الراقية من خلال استخدام أنواع من المواد المطفرة الفيزياوية والكيماوية. إذ إن مقدرة أنواع من المواد الكيماوية والأشعة على إحداث الطفرات وبتكرارٍ عالٍ، جعلت من الممكن إجراء العديد من الدراسات الوراثية التي لا يمكن تطبيقها على الطفرات الطبيعية النادرة الحدوث. نتيجة لذل ك فقد استند فهمنا لوراثة الكائنات الراقية على الدراسات التي تستفيد من تحفيز الطفرات لغرض تحليل وظائف الجينات . كان للمواد القلوية دوراً قيماً في فهم وظائف البروتينات ورسم الخرائط الجينية من خلال إحداثها لطفرات نقطية (Point mutations)، وبسبب التكرار العالي التي تتمتع بها هذه الطفرات وفائدتها الكبيرة، فقد استمرت المطفرات الكيماوية كطريقة فعالة في البحث عن الطرز المظهرية الجديدة بالرغم من تطور أنواع أخرى من أدوات التطفير[6]. يعد التغاير الوراثي من أقوى واهم المصادر التي استغلت من قبل الإنسان عبر آلاف السنين لتطوير المعرفة البيولوجية واستنباط الأنواع والأصناف النباتية التي أصبحت جزءاً لا يتجزأ من حياتنا اليومية. إن توفر المعلومات الخاصة بتتابع الجينوم في عدد من الأنواع النباتية والتطور الحاصل في عدد من تقنيات الوراثة الجزيئية في السنوات الأخيرة، قد ساهم في زيادة المقدرة على تشخيص وهندسة مثل هذا التغاير ضمن مواقع جينية محددة " الوراثة العكسية Reverse genetics" ، كما أسهم أيضا في تنقية منظورنا لوظائف الجينات واستخدام الهندسة الوراثية. قدم التطور السريع في تقنيات البيولوجي الجزيئي وDNA إمكانيات لم يكن يحلم بها من قبل في رفع كفاءة تقنيات التطفير لدراسة وراثة وتربية المحاصيل، وتحقق هذا في عدة مجالات أولاً: أصبح بالإمكان إجراء الانتخاب للطفرات على مستوى DNA باستخدام تقنية **(تِلِنك)** في الصفات التي تخضع لسيطرة جين أو مجموعة جينات معلومة [23]، خصوصاً إذا ما كان بالإمكان تطبيق طرائق سهلة لهذا الغرض، مثل الكشف عن تعدد أشكال النوكليتايد المفرد(SNP) في المجتمعات الطبيعية بأستخدام هلام Agaros [11] وفي المحاصيل المتضاعفة أيضاً [55].

ثانياً: إن استخدام المعلمات المرتبطة مع DNA في بعض الطفرات المهمة ستسهل بشكل كبير من استخدامها في برامج التضريب لأغراض التربية، مثل (Marker Assisted Selection)(MAS). ثالثاً : إن تقنيات DNA تعد مهمة أيضا في إرساء خطوات عمل فعالة في تحفيز الطفرات. وبذا فان المعلومات المتراكمة عن الأضرار الحاصلة في DNA وإعادة الازدواج ستقود إلى إلمام اكبر بالمعلومات الضرورية لتصميم برامج التطفير [54].

تبرز **(تِلِنك)** كتقنية فريدة ومتعددة الاستخدام من بين مختلف التقنيات المتوفرة لتشخيص تتابع DNA أو تتابع أشكال الجين المتعددة (Polymorphism). كما يمكن من خلالها تحديد الطفرات النقطية في جينات معينة لدراسة أو تعديل وظائف الجين، فضلاً عن استخدامها لتحديد المعلمات الوراثية في دراسة المجتمعات النباتية [17]. إن الدور الكبير الذي أصبحت تلعبه الور اثة العكسية عموماً و **(تِلِنك)** خصوصاً، يجعل من الأهمية بمكان توضيح مفهوم هذه الطريقة وخطوات تطبيقها، فضلاً عن نقاط القوة والضعف فيها. كما سيجري توضيح إمكانية التطبيق العملي لهذه التقنية والتوقعات المستقبلية لها، بدءاً من إنشاء المجتمع المطفر حتى تحديد الطفر ات المرغوبة. كما سنناقش التقدم الذي يمكن إحرازه في التطبيقات الحالية وتأثير التقنيات الحديثة في تشخيص الطفرات وعلاقة ذلك بالتقنية قيد البحث، وأهم خطوات إرساء برنامج **(تِلِنك)**.

الطفرات

يمكن تعريف الطفرة على إنها: أي تغير يطرأ على المادة الوراثية DNA أو RNA للكائن خلافاً للحالة الاعتيادية، الذي قد وقد لا يؤثر في طبيعة الوظائف البايلوجية لذلك الكائن.

تصنيف الطفرات

أولاً : بحسب تأثيرها في التركيب : يمكن أن يتغير تسلسل الجينات بعدة طرائق لدى وجود عوامل التغيير . إن لطفرات الجين تأثيرات تعتمد على مكان حدوثها وعلى م ا إذا سببت تبدلاً في وظائف البروتينات الأساسية أم لا. يمكن تصنيف الطفرات تركيبياً إلى:

1. الطفرات القليلة الحدوث (Small-scale mutations): تؤثر مثل هذه الطفرات في جين صغير في نوكليتايد واحد أو أكثر وتتضمن:

أ. الطفرات النقطية: وتنجم عادةً عن التعرض للمواد الكيماوية أو إعاقة تضاعف DNA، وتسبب تبديل نيوكليوتيد بآخر [16]، وأكثرها شيوعاً هو تغير الموقع الذي تستبدل فيه قاعدة بيورين مكان قاعدة بيورين أخرى (A↔G) أو بايريمدين مكان بايريمدين أخرى (C↔T). يمكن أن يحدث تغير الموقع بسبب التعرض إلى حامض معين أو عدم ازدواج القواعد. أما النوع الثاني من هذه الطفرات وهو الأقل شيوعاً فهو استبدال البيورين محل البايريميدين أو العكس (C/T↔A/G). يمكن أن تنعكس الطفرة النقطية بواسطة طفرة نقطية أخرى، ليعود بذلك النوكليتايد إلى وضعه الطبيعي (الانعكاس الصحيح)، أو قد يتم ذلك نتيجة الانعكاس في موقع نوكليتايد آخر(وهي نوع من الطفرات التكميلية التي تحدث في مكان ما وينتج عنها استعادة الجين لوظيفته) وتصنف هذه التغيرات وراثياً على أنها انتقال (Transition) وانقلاب (Transversion) [16]، وكمثال على الانقلاب هو تحول الأدنين (A) إلى سايتوسن (C). يمكن تصنيف الطفرات النقطية التي تحدث في منطقة تشفير البروتين في جين ما إلى ثلاثة أنواع وذلك اعتماداً على نوع التشفير:

1- الطفرات الساكنة (Silent mutations): تشفر لنفس الحامض الأميني.

2- طفرات التشفير الخاطئ (Missense mutations): تشفر لحامض أميني مختلف.

3- طفرات وقف التشفير (Nonsense mutations): تشفر لإيقاف أو قطع تصنيع البروتين.

ب- طفرات الحشر (الإدخال) (Insertion mutations): وهي طفرات تتضمن إضافة نوكليتايد إضافي واحد أو أكثر في DNA، وعادةً تتسبب العناصر المنتقلة (Transposable elements) في مثل هذا النوع من الطفرات أو لحصول أخطاء أثناء مضاعفة العناصر المتكررة. إن عملية الحشر في منطقة تشفير الجين ربما تبدل وصلات mRNA أو قد تسبب تبدل في إطار القراءة (Reading frameshift) وكلاهما يمكن أن يغير من طبيعة البروتين المصنّع. يمكن أن تعكس طفرة ا لحشر بواسطة أجزاء أو قطع العناصر المنتقلة.

ج- طفرات الحذف (Deletion mutations): وهي إزالة نوكليتايد واحد أو أكثر من DNA، وكما هو الحال في طفرات الحشر، يمكن لهذا النوع من الطفرات أن يبدل إطار قراءة الجين (Reading gene frameshift)، عموماً فان مثل هذه الطفرات غير قابلة للعكس. يعتقد أن نفس التتابع يمكن أن يعاد من خلال طفرة الحشر، إذ يمكن للعناصر المنتقلة أن تعكس طفرة حذف صغيرة (1-2 قاعدة) في أي موقع، ومن النادر جدا حدوث مثل هذا أو قد لا يحدث على الإطلاق، كما يلاحظ أن طفرة الحذف تلك ليست على العكس تماماً من طفرة الحشر. إذ أن الأولى عشوائية تماماً، في حين تتضمن الثانية تتابعاً محدداً يحشر في مواقع ليست عشوائية كلياً كما يمكن أن لا تكون مشخصة تماماً.

2. الطفرات الواسعة الحدوث (Large-scale mutations):

أ. طفرة التضاعف (Amplification mutation): يقود هذا النوع من الطفرات إلى تعدد نسخ جميع أجزاء الكروموسوم وزيادة الجرعة الجينية التي قد تترتب على ذلك التعدد.

ب- طفرة الحذف (Deletion mutation) : وهي حذف أجزاء كبيرة من الجينوم، وبالتالي فقدان عدد من الجينات التي تقع فيها.

ج- الطفرات التي تؤثر في قطع DNA المفصولة مسبقاً: وبذا فهي طفرات تجمع جينات منفصلة لتشكل مجموعة جينات مدمجة مع بعضها البعض وفعّالة وظيفياً، وهذا النوع يشمل:

1- انتقال الكروموسومات: هو تبادل الأجزاء الوراثية بين الكروموسومات غير المتماثلة.

2- حذف الحشر: هي طفرات الحذف التي تقع بين الكروموسومات وفيها تزال قطعة DNA التي كانت قد حشرت سابقاً.

3- انقلاب الكروموسومات (Chromosomal inversion): وفيه يتغير اتجاه قطع الكروموسومات، فيتغير تتابع النيوكليتايدات.

4- فقد التباين الوراثي: هو فقدان لأليل واحد، سواء كان بالحذف أو بإعادة الاتحاد في الكائنات التي تمتلك أليلين مختلفين مسبقاً.

3. طفرات فقد الوظيفة (Loss-of-function mutations): هي طفرات تكون فيها نواتج الجينات ذات أداء منخفض أو ليس لها وظيفة بتاتاً، فإذا فقد الاليل وظيفته كلياً (null allele) تدعى حينها الطفرة (amorphic). إن اغلب الأشكال المظهرية التي تحدث فيها مثل هذه الطفرات تكون متنحية [42]، يستثنى من ذلك الكائنات الأحادية المجموعة الكروموسومية (Haploids)، أو عندما يكون خفض جرعة نواتج الجين غير كافٍ ليعطي الشكل المظهري وهذا يدعى (Haplansufficiency).
4. طفرات الاستحواذ على الوظيفة (Gain-of-mutation): هو تغير في ناتج الجين بحيث يستحوذ على وظيفة جديدة غير اعتيادية، وعادةً تكون الأشكال المظهرية الناتجة عن هذا النوع من الطفرات من النوع السائد وتدعى (Neomorphic).
5. طفرات السيادة السالبة (Dominant negative mutations): يحدث في هذا النوع من الطفرات تبدل في منتج الجين الذي يعمل بشكل مضاد لاليلات النوع البري وقد تسمى طفرات (antimorphic). تسبب هذه الطفرات تبدل الوظيفة الجزيئية وينتج عنها شكل مظهري سائد أو شبه سائد للصفة غير المرغوبة.
6. الطفرات المميتة (Lethal mutations): هي طفرات تسبب هلاك الكائن الحي الذي تحدث فيه.

ثانياً : تقسيم الطفرات بحسب تأثيرها المتوقع على الشكل المظهري

1 -الطفرات المظهرية (Morphological mutations): تؤثر هذه الطفرات في المظهر الخارجي للأفراد، إذ يمكن أن تغير من ارتفاع النبات أو من ملمس البذور ناعمة أو خشنة.
2 -الطفرات الكيموحيوية (Biochemical mutations): تتسبب هذه الطفرات بأضرار تتوقف على أثرها المسارات الإنزيمية، في الغالب تكون الطفرات المظهرية نتيجة مباشرة لطفرات المسارات الإنزيمية، وتقسم بدورها إلى:

أ. طفرة الجين المتباين (Heterozygous mutation) : وهي طفرة في أليل واحد من الأليلين ليصبح الجين بأليلين مختلفين.
ب. طفرة الجين المتماثل (Homozygous mutation): هي طفرة تحدث في احد أليلي الجين ليكونا متماثلين.
ج. الطفرات المركبة للكائنات المتباينة التركيب الوراثي: وفيها تحدث طفرات مختلفة في أليلات كل من الأب وألام [50].

ثالثاً: التقسيم الخاص

الطفرات المستحثة بالظروف البيئية: وهي طفرات عادةً ما تحدث في الأنواع البرية تحت ظروف بيئية معينة، وهذه الظروف أما تكون ظروف مُقيّدة (Restrictive conditions) أو غير مُقيّدة (Permissive conditions). مثال ذلك قد تسبب طفرات التحسس لدرجات الحرارة في موت الخلايا في حال ارتفاع درجة الحرارة (Restrictive)، بينما لا تكون لها أية تبعات مضرة فيما لو انخفضت درجة الحرارة (Permissive)، علماً أن موت الخلايا المبرمج (Programmed cell death) هو نظام حيوي مبرمج في الكائن الحي بحسب طبيعته الوراثية، لكنه يتأثر أحياناً بالعوامل الخارجية، وذلك بحسب الجنس والنوع والعضو ومرحلة النمو أو التشكّل.

أسباب الطفرات

هناك قسمان رئيسيان هما الطفرات التلقائية (Spontaneous) والطفرات المستحثة (Induced) التي تسببها المواد المطفرة.

أولاً : الطفرات التلقائية : تتضمن هذه الطفرات على المستوى الجزيئي ما يلي:

1. Tautomerism: هو تغير القاعدة نتيجة تغير موقع ذرة الهيدروجين.
2. Depurination: هو فقدان قاعدة بيورين (A , G).
3. Deamination: هو تغير القاعدة الاعتيادية إلى قاعدة أنموذجية مثل تغير C إلى U (التي يمكن تصحيحها بواسطة آلية إعادة ازدواج قواعد DNA) أو غير ذلك، ويشمل التغير حذف (NH2)
4. الانتقال: هو انتقال البيورين إلى بيورين آخر، أو تحول البايريمدين إلى بايريمدين آخر.
5. الانقلاب: هو تحول البيورين إلى بايريمدين أو العكس.

ثانياً: الطفرات المستحثة:

1) الطفرات المستحثة بالمواد الكيماوية تشمل:
أ.(Nitrosoguanidine) (NTG).
ب.(Hydroxylamine) (NH2OH).
ج. نظائر القواعد: مثل (BrdU) .
د. المواد الكيماوية البسيطة: مثل الحوامض.
هـ. المواد القاعدية: وتتضمن المواد التالية:
1. (Ethyl Nitrosourea) (ENU): يمكن أن تحفز هذه المواد طفرات تضاعف أو عدم تضاعف DNA، و بالمقارنة مع نظائر القواعد فان الأخيرة يمكن أن تسبب طفرة في DNA فقط عندما تشترك تلك النظائر في تضاعفه، وهكذا نجد أن لكل مادة من هذه المواد تأثيراً معيناً يقود في النهاية إلى طفرات انقلاب أو انتقال أو حذف.
2. العناصر التي تضيف المثيل (Methylation agents): مثل EMS (Ethyl Methane Sulfonate) (CH_3)
3. الهيدروكربونات المتعددة الحلقات (Polycyclic hydrocarbons).
4. مركبات إقحام DNA (Ethidium bromide).
5. موصلات تقاطع DNA DNA (Crosslinkers) مثل (Platinum).
6. أضرار الأكسدة الناجمة عن الأوكسجين.

2) الطفرات المستحثة بالأشعة غير أيونية: طفرات الأشعة فوق البنفسجية: وهي إثارة الالكترونات إلى مستوى الطاقة الأعلى، فتمتص جزيئات DNA الأشعة فوق البنفسجية بشكل جيد، خصوصاً ذات الطول الموجي القصير الذي يتراوح بين 260 إلى 280 نانوميتر(nm).
إن أكثر قواعد النوكليتايد في DNA القابلة للانجراح بواسطة الاستثارة هما السايتوسين والثايمين، مما قد يغير خصائص ازدواج القواعد، كما يمكن للأشعة فوق البنفسجية أن تحفز قواعد الثايمين في DNA للازدواج مع بعضها البعض.

3) الطفرات المستحثة بالأشعة الأيونية.

4) الإصابات الفايرسية: يمتلك DNA مناطق تدعى (Hot spots)، وهي مناطق تحدث فيها الطفرات بتكرار أكثر من مائة ضعف عن معدل الطفرات الاعتيادية. إذ يعتقد مختصو التطور أن المعدل العالي للطفرات قد يكون مفيداً في بعض الأحيان لأنه يسمح باستمرار الكائن الحي (تطوره) وبالتالي تكيفه بشكل أسرع للظروف البيئية الجديدة التي يعيش فيها أو قد يعيش فيها لاحقاً.

أنواع الطفرات عموماً:

1 –طفرات التكيف (Adaptive mutations): هناك عدد من الأفكار المتداولة بين مختصي البايولوجي بخصوص اثر الطفرات في تكيف النباتات . وجد أن معدل حدوث طفرات معينة في بعض الحالات يكون اكبر عندما تكون هذه الطفرات مفيدة.

2 –الطفرات الرجعية (Back mutations): طفرات تتضمن تغيراً في زوج من النوكليتيدات نتيجة طفرة نقطية في تتابع DNA، يسترجع على أثرها الكائن التتابع الأصلي وبالتالي الشكل المظهري [14].

3 –طفرات تبدل الإطار (Frameshift mutations): هي طفرات حشر أو حذف عدد من النوكليتيدات غير القابلة للقسمة على ثلاثة في تتابع DNA، وهذا ناتج عن الطبيعة الثلاثية للتعبير الجيني بواسطة الشفرات (Triplets). إن الحشر أو الحذف يمكن يعيق قراءة الإطار ومجاميع الشفرات، مما يتسبب بترجمة تختلف كلياً عن الأصلية. كلما كانت طفرات الحشر أو الحذف مبكرة كلما غيرت البروتين المنتج بشكل اكبر.

4 –طفرات التشفير الخاطئ (Missense mutations): هي نوع من أنواع الطفرات النقطية التي يحدث فيها تغير نوكليتايد واحد مما يؤدي إلى إنتاج حامض أميني مختلف يؤدي بدوره إلى فقدان البروتين لوظيفته. إن مثل هذه الطفرات هي المسؤولة عن الإصابة بالعديد من الأمراض للناس المعرضين لهذه الطفرات[68].

5 –طفرات توقف التشفير (Nonsense mutations): هي طفرات نقطية في تتابع DNA تتسبب في إيقاف مبكر للتشفير في النوكليتايد أو mRNA المستنسخ ويمكن أن تسبب قطع أو إنتاج بروتين فاقد لوظيفته.

6 –الطفرات المحايدة: طفرة تحدث في شفرة الحامض الأميني (عادةً في جزيئة mRNA) وينتج عنها استخدام حامض أميني مختلف، إلا انه مماثل للحامض الأميني الأصلي من ناحية التركيب الكيمياوي.

7 –الطفرة النقطية: تتضمن استبدال زوج من قواعد النوكليتايد المفرد بزوج آخر . تتضمن هذه الطفرات أيضاً الحشر والحذف لزوج واحد من القواعد.

8 –الطفرات الساكنة: هي طفرات في DNA لا تسبب تغييراً في تتابع الحامض الأميني ضمن البروتين المصنع، وربما تحدث في المناطق غير المشفرة (non-coding region) (خارج الجين أو ضمن intron) وقد تحدث في (exon) بشكل لا تؤثر معه في التتابع النهائي للحامض الأميني المصنع، وهي تختلف عن طفرة (Synonymous mutation) التي تحدث فقط في الاكسون، علماً ان الانترون هو جزء الكروموسوم غير الفعال، والاكسون عكسه لكنه غريب عن الكروموسوم.

تقنيات الوراثة العكسية

طوّرت (**تِلِنك**) في بادئ الأمر على نباتات أذن الفأر (*Arabidopsis thaliana*) كطريقة للوراثة العكسية ولتكون مكملة للتقنيات الموجودة آنذاك [36]. توجد عدة طرائق للوراثة العكسية تؤدي جميعها إلى فقدان وظيفة الجين في النباتات ومنها RNAi (عملية خلوية يحدث بها أن جزيئات RNA المزدوج (dsRNA) تنفك مسببة سكون الجين المتعلق الذي يؤثر في mRNA الناتج)، ويشار فيها عادة إلى سكون الجين بعد عملية الاستنساخ وتشخيص حالات الإضافة أو الحذف لجينات معينة في النباتات ضمن المجتمع. إن لكل من هذه الطرائق نقاط قوة وضعف يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار لدى اختيار أي منها للحصول على النتائج المرغوبة. تتطلب طريقة RNAi إنشاء أو بناء جينات من نوع (Chimeric) التي تتألف من تتابع معلوم وغير معلوم من الجينات المستهدفة، واستنساخ أي منها سيشكل شريط mRNA مزدوج. عندما ينقل جين (Chimeric) إلى النوع المرغوب، سوف يُحفِّز شريط mRNA المزدوج عملية تحلل جين (endogenous mRNA) مما يسبب السكون الجيني بعد الاستنساخ [34, 24,15] . على العكس من النماذج الأخرى للوراثة العكسية فلا تحتاج RNAi إلى مجتمع مطفر كبير . إن طبيعة تسّيد RNAi تسمح بتشخيص الأشكال المظهرية حتى في الأفراد المتماثلة في تركيبها الوراثي، إلا أن عدم فائدة الطريقة لدراسة الجينات التي فقدت وظيفتها هي هلاك الأفراد أو أن تصبح عقيمة. يختلف مستوى سكون RNAi وبالتالي تختلف شدة تغاير الأشكال المظهرية بين السلالات المستقلة التي حوّلت بنفس الطريقة . عادة ما يكون هناك تباين في مستوى السكون الذي يتراوح بين السكون الجزئي وبين عدم وجوده نهائياً، والأخير نادر الحدوث.

تم استخدام كل من طفرة (Transposon) و T-DNA في الوراثة العكسية في النبات، وتتطلب طفرة

(Transposon) نظام (Active Transposon System) فعّال ومعلوم التتابع وموجود في النوع المرغوب، بينما تتطلب طفرة T-DNA نظام تحويل بكتيري كفوء (Agrobacterium transformation) لتكوين مجتمع طافر كبير كفاية لتطبيق الوراثة العكسية . لذلك تعد هذه الطرائق ذات فائدة محدودة لتلك الأنواع التي تتوفر فيها المعايير اللازمة. في النباتات التي تكون مطواعة لهذه التقنية يمكن تشخيص عملية الحشر في الموقع المستهدف بـواسطة تضخيم PCR وباستخدام بادئ جين محدد وبادئ حشر محدد [72,35,2]. تحدث عملية الحشر في الجينوم بصورة عشوائية نسبياً ويمكن أن تسبب طفرات فقدان وظيفة الجين (Knockout) ويميل عادةً تكرار الطفرات لان يكون منخفضاً، مما يتطلب إجراء عملية البحث في مجتمعات كبيرة الحجم لتزداد تبعاً لذلك فرص العثور على الجينات المحشورة، وهذا الأمر مرتبط بدرجة ما بحجم الجينوم، إذ يحتاج مثلاً نبات أذن الفأر (على الرغم من صغر حجم جينومه) إلى مجتمع حجمه بين مائة ألف إلى مائتي ألف نبات!!، ويزداد هذا الحجم نسبياً بزيادة حجم الجينوم في الأنواع المختلفة. أما التقنية الأخرى المستخدمة في الوراثة العكسية فتتضمن الكشف عن حالات الحذف في الجينات المستهدفة، ويستخدم تضخيم PCR لهذا الغرض أيضا . تستخدم البوادئ لمضاعفة نسخ التتابع المستهدف في DNA جينومات الأنواع التي تم عزلها من النباتات المطفرة بالأشعة الأيونية (التي تحفز حذف الجينات). يشخص الحذف بوجود منتج PCR الذي يكون اقصر من ذلك الذي تمت مضاعفة عدد نسخه في النوع البري [31 ,32]. طالما يمكن إحداث الطفرة بالأشعة في جميع الكائنات الحية تقريباً، لذا فان هذه الطريقة أكثر انتشاراً من طريقة التطفير بالحشر، إلا أن الطريقتين متشابهتان من حيث تسببهما حالة (Knockout). تختلف عموماً طفرات الحذف بالحجم كما يمكن أن تتسبب بإنهاء وظيفة أكثر من جين في موقع واحد، وهذه الحالة " إنهاء وظيفة أكثر من جين " يمكن أن تكون ذات فائدة في حالة التضاعف المزدوج (Tandem duplication)، إلا إنه سيكون من الصعب تمييز وظيفة الجين المفرد استناداً إلى الطفرة المظهرية، وبما أن تكرار طفرة الحذف واطئ نسبياً، لذا فهناك حاجة دائماً إلى مجتمع كبير الحجم من الأفراد الطافرة " أكثر من مائة ألف فرد " للتأكد من إمكانية عزل الطفرة في الجين المستهدف.

الطفرات التقليدية تلتقي مع بحوث الجينوم الفعّال:

بينما تكون نقطة الشروع في الوراثة التقليدية تحديد الشكل المظهري المرغوب وتنتهي عادةً بعزل الجينات المتحكمة فيه، تزداد الحاجة إلى تحليل وتحديد النباتات التي تمتلك جينات مهمة تم تغييرها أو تدميرها بواسطة المطفرات . إن الحجم الهائل من البيانات المتحصلة من تحديد التتابع في الجينات بدون توفر الفهم الدقيق لوظائف تلك الجينات، يحتم اعتماد تحديد التتابع نقطةً للانطلاق في طرائق الوراثة العكسية.

غيرت مشاريع تحديد التتابع في DNA الطريقة التي يتم بها تطبيق أساسيات علم الأحياء، فـقد أفضى المسعى التقليدي في تحديد الشكل المظهري من خلال تتابع الجينات إلى حالة معاكسة، حيث يمكن التعرف على الجينات من خلال تتابعها في حين يبقى الشكل المظهري مجهولاً . لذا أصبحت الوراثة العكسية هدفاً يسعى لتحقيقه اغلب المختصين في علم الأحياء، فأصبحت الحاجة ملحة للمزيد من التقنيات الحديثة [43]، وعلى العكس من التقنيات المطبقة في مجال بحوث الجينوم مثل تتابع DNA وأداة البحث عن التعديل ألموقعي الأساسي (Basic (BLAST) Local Alignment Search Tool) ، فأن طرائق الوراثة العكسية غير قابلة للتطبيق في جميع الكائنات الحية، مثال ذلك لمّا أعادت طفرات الحشر (Insertion) بطريقة T-DNA مشكلة استبعاد الجينات (Knockout) في أكثر من 70% من جينـــات نباتـــــــــــات أذن الفأر [2]. لا توجد بحوث مماثلة على الرز أو الذرة الصفراء بالرغم من التغطية الواسعة لتتابع الجينوم في تلك الأنواع. يعد السكون الجيني في طريقة RNAi أحد أهم الاجراءات المفيدة في مجال الوراثة العكسية [74]، إلا أن نتائجه محدودة بسبب صعوبة إيصال (siRNAs) إلى الموقع المستهدف. إن لطريقة (**تِلِنك**) تطبيقات واعدة في مختلف المجالات، كما أنها تعد جذابة ليس فقط بالنسبة لبحوث وظائف الجينوم ولكن للتطبيقات الزراعية أيضاً،

حيث أنها لا تتضمن تحويرات الهندسة الوراثية فحسب [26]، وإنما إمكانية استخدام هذه التقنية بكفاءة عالية في تحديد التغاير الوراثي الطبيعي في المجتمعات الطبيعية، وفقاً لما يطلق عليه (**أكوتِلِنك**) (ECOTILLING).

الانشطار الإنزيمي غير المطابق للتحديد العالي:

وضعت الخطوات العملية التي تستخدم فيها إنزيمات شقوق الاضطراب في تحديد الطفرة في زوج واحد من القواعد لغرض الإنتاج التجاري [63]. طبقت هذه الخطوات لأول مرة في (مشروع سياتل لأبحاث **تِلِنك**) (STP) (Seattle TILLING Project)، إذ استخدم للبحث عن أفراد نباتات أذن الفأر الطافرة بعد معاملة مجتمعاتها بمادة (EMS) التي أعدت لهذا الغرض [64]. ساهم هذا المشروع في تقديم أكثر من ستة آلاف طفرة مستحثة بمادة EMS في النبات المذكور. بسبب كون (**تِلِنك**) تعد إجراءاً عاماً ضمن ما بات يعرف بالوراثة العكسية، فقد توسعت البحوث لتشمل الإنتاج التجاري في عدد من الكائنات الحية الأخرى التي يمكن إنتاج وتطوير السلالات الطافرة فيها. بوشر مؤخراً في مشروع (STP) ومشاريع أخرى في الإنتاج التجاري في كل من ذبابة الفاكهة(*Drosophila melanogaster*) والذرة الصفراء (*Zea mays*). استخدمت التقنية ذاتها في تشخيص SNP في المجتمعات الطبيعية، حيث استخدمت في البدء لتحديد ورسم الخارطة الوراثية للأنواع البرية من نبات أذن الفأر [10]. إن تكرار SNPs بين الأفراد المتباينة وراثياً "يكون عادةً بمعدل0.1 لكل زوج من القواعد بين الجينومات المختلفة " هو أعلى بكثير من معدل الطفرات المستحثة. لذا فأن (**أكوتِلِنك**) ليست الطريقة الأكثر كفاءة في تشخيص التراكيب الوراثية إلا انه وبالرغم مما ذكرنا، فأنها يمكن أن تستخدم بكفاءة بعد انعزال الاليلات في المجتمعات الكبيرة وهي ملائمة جداً لتشخيص SNP غير الاعتيادي"المغاير" الذي جرت العادة على تشخيصه من خلال تحديد التتابع الكامل (Full Sequencing). يجب أن تكون تقنية (**أكوتِلِنك**) فعّالة في الكشف عن SNP المغاير إذا ما قورنت بطريقة تحديد التتابع الكامل، وذلك لان التفتيش عن قطعة حجمها kb1.5 تقريباً على أطباق Microtiter يسمح بتحديد ورسم خارطة دقيقة لا يمكن تطبيقه عملياً بطريقة تحديد التتابع الكامل.

الكشف عن الطفرات والتعدد النادر للأشكال:

تقع إجراءات اكتشاف الطفرات في قسمين رئيسيين، اعتماداً على فيما إذا كان المطلوب هو تحديد الأضرار المعلومة الموجودة حالياً في الجينوم، أم اكتشاف ألأضر ار القديمة غير المعلومة [22]. تعد عملية البحث عن الطفرات الموجودة حالياً أو تعدد أشكال الجين هي المهمة الأسهل، وذلك لأنه يمكن أن تقسم الكواشف المستخدمة حتى على مستوى الضرر المفرد .مثال ذلك عندما يضخم التتابع المتعدد الأشكال (dCAPS) فأن بادئ PCR يصمم للكشف عن الاختلاف الموجود في زوج واحد من القواعد [45]، كما لابد من استخدامه للتحقق من دقة تصنيف التراكيب الوراثية الذي تم بواسطة PCR. على أية حال، يجب أن يتم تحديد الطفرة لاحقاً لان اكتشاف الطفرة مهمة ليست بالسهلة، وسابقاً كان يتم تحديدها من خلال إعادة تحديد التتابع (Resequencing) [46]. عموماً فأن تعدد الأشكال يبدو كقمم متداخلة، وهو يشكل تحدياً كبيراً لتمييز هذه الأشكال عن حالات تحديد التتابع الخاطئ والحالات الأخرى التي يلفها الغموض، مما يؤدي إلى معدلات عالية من ايجابيات الخطأ ويستدعي إجراء تحليل الأتمتة (Automated trace analysis) [75].

تستخدم طريقة تحديد التتابع لاكتشاف الاليلات الاعتيادية، ومن المفترض إن تكون هذه الطريقة كافية لسببين : الأول: لان عملية الفصل يمكن أن تثبت ما سوف تفشل الطرائق الأخرى في ترجمته أو يترجم على انه مجهول، وثانياً : يبدو من المعقول أن يكون تحديد تتابع كل قالب على حدة كفوءاً إذا ما كانت جميع القطع الكبيرة تمتلك نفس التغيير في تتابع القواعد [3].

بالنسبة إلى تحديد التتابع الكامل، فأن الطرائق المستخدمة في اكتشاف الطفرات، تعطي معلومات غير كاملة عن الأضرار(الطفرات) التي يتم تحديدها . تحدد العديد من الطرائق المستخدمة لاكتشاف الطفرات، معلومات متباينة عن الشريط المزدوج بين النوع البري و الأشرطة الطافرة. مثال ذلك، فك ارتباط (High Performance Liquid Chromatography) HPLC (Denaturing HPLC) [69]، يمكن أن يعيد تحديد جميع التغايرات المحتمل

حدوثها في قطع الشريط المزدوج، اعتماداً على تأثير عدم أو قلة استقرار شريط DNA المزدوج على المنطقة الكارهة للماء. هناك طرائق أخرى تستخدم لهذا الغرض مثل (Denaturing Gradient Gel DGGE) Electrophoresis [32,1]، وطريقة (Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis) (SSCP) [21]، لذا فأن هذه الطرائق تتبعها عادة عملية تحديد التتابع الكاملة لقطعة DNA الطافرة . إن الطرائق المستخدمة لتحديد مواقع وعدد النسخ المضاعفة في قطعة DNA ، مثل (**تِلِنك**) [9] لا تتطلب سوى تحديد (Single-pass) جزئي لإكمال عملية الاكتشاف . في بعض التطبيقات، فان المعلومات غير الكافية التي يتم الحصول عليها من تحديد الطفرة ستكون كافية وتوفر بصمة للأليل أو التركيب الوراثي الذي يمكن استخدامه في التحليل الوراثي أو رسم الخارطة الوراثية. أما في حالة استخدام (**تِلِنك**) فأنه يتم الحصول على البصمة من استخدام التكبير العالي لل هلام (High-resolution gels) لتحديد القطعة المجروحة وعلى مستوى الزوج المفرد من القواعد وبمقدار kb واحدة فقط للعديد من التغايرات. ان الخطوات المتبعة في (**تِلِنك**)لا تختلف في عملية التطفير عن خطوات العمل التقليدية التي استخدمها مختصو الوراثة لعدة عقود [23].

التطبيق العملي للطفرات مفردة النوكليتايد:

يتم في (**تِلِنك**) تفتيش جينوم الكائنات الحية التي تم تعريضها لمواد مطفرة للبحث عن طفرات في جينات معينة، وتحديداً على مستوى زوج واحد من القواعد. برزت (**تِلِنك**) كطريقة رائدة في وراثة وتربية النبات منذ الاستخدامات الأولى لها في نبات أذن الفأر [37]، وذبابة الفاكهة [5] وقد تطرق عدد من الباحثين لأهمية هذه الطريقة [59,17]. باختصار فأن (**تِلِنك**) تعطي مدىً واسعاً من الأليلات الطافرة وإمكانية تطبيقها لتشمل جميع الكائنات الحية التي يمكن إحداث طفرات في مادتها الوراثية، كما يمكن تطبيقها بكفاءة عالية في أنواع الكائنات التي تكون مصادر الجينوم فيها محدودة.

يمكن لتقنية (**تِلِنك**) تشخيص الطفرات النقطية التي يمكن استحداثها بسهولة وبتكرارٍ عالٍ بواسطة المطفرات الكيماوية . يمكن تطفير الجينومات بتكرارٍ كافٍ بغض النظر عن حجم الجينوم، إذ يكون بمقدور أغلب الجينومات تحمل شدة تكرار عالية للطفرات. يبلغ حجم المجتمع المطفر المطلوب لتطبيق (**تِلِنك**) عشرة آلاف فرد أو أكثر، مقارنة بالطرائق الأخرى التي تتطلب مجتمعاً مطفراً يتجاوز حجمه مائة الف الى مائتي الف فرد فاكثر !!، فضلاً عن أن مشكلة دراسة الأنواع الخليطة التركيب الوراثي لم تعد قائمة، حيث يمكن تشخيص الطفرات في الأفراد المتباينة وراثياً باستخدام هذه التقنية. كما لن تكون هناك حاجة لإجراء عملية التحويل، وهذا يجعل من الممكن تشخيص الطفرات في الأنواع التي لا يمكن إجراء عملية التحويل فيها (تكون فيها عملية التشخيص غير كفوءة) باستخدام تقنية (**تِلِنك**)، فضلاً عن إمكانية استخدامها للأغراض التجارية، نتيجة العزوف الكبير عن المنتجات المعدلة وراثياً . شهدت السنوات الخمس الأخيرة تطوير واستخدام أنواع مختلفة من المجتمعات النباتية المطفرة في تقنية (**تِلِنك**)، منها نبات أذن الفأر واللوتس والشعير والحنطة والذرة الصفراء [66,55,49,36,9,7] فضلاً عن استخدامها في أنواع من الحيوانات منها سمك حمار الوحش (Zebra fish) والجرذان وذبابة الفاكهة [76,56,13] ،وتضاف أنواع أخرى لهذه القائمة بين حين وآخر.

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

تُستخدم (**تِلِنك**) كما هو الحال في جميع طرائق الوراثة العكسية لتشخيص الطفرات التي تحدث بعد تعريض المادة الوراثية للطفرات. تتميز هذه الطريقة بمقدرتها على تشخيص الطفرات النقطية. يمكن إحداث الطفرات النقطية بتكرار عالٍ باستخدام مطفرات مختلفة [40]، إلا أن المادة الكيماوية القاعدية (EMS) هي المادة المختارة في إحداث الطفرات التي يتم تشخيصها بتقنية (**تِلِنك**). يمكن استخدام EMS لتحفيز طفرات فقد وظيفة الجين الابتدائية في الجينات المتنحية وبتكرار أعلى بعدة مرات مما هو عليه في طفرات الإضافة والحذف [20]. تتسبب مادة EMS بتحورات في تركيب النوكليتايد تنتهي عادة بحالات فشل ازدواج أو تغيرات أساسية في القواعد . يظهر دور EMS من خلال إضافة مجموعة الاثيل إلى الكوانين لتكوّن (ethylguanine) التي يمكن أن تزدوج مع الثايمين (T)

ولكن لا يمكنها ذلك مع السايتوسين (C)،عندها ومن خلال إعادة الازدواج في DNA سوف يحل الزوج الأصلي (G/C) محل (A/T) [20]. ظهر انه في 99% من الحالات إن EMS يساعد على إحلال (C) محل (T) مما ينتج عنه إنتاج (C/G) بدلاً من (T/A)، في حين يلاحظ أن مادة MMS (Methyl Methane Sulfonate) تسبب انقلاباً في إنتاج (G/C) بدلاً من إنتاج (T/A) [14, 20, 50].

كذلك وجد أن استخدام EMS بتراكيز منخفضة يمكن أن يسبب حدوث طفرات انقلاب (G/C) إلى (C/G) أو (G/C) إلى (T/A). إن مقدرة هذه المواد على إحداث الطفرة بتكرارٍ عالٍ، يقلل من حجم المجتمع اللازم لتطبيق (**تِلِنك**)، وهذا يؤدي بدوره إلى تقليل الوقت والمال اللازمين لذلك . مثال ذلك، إن إخضاع ثلاثة آلاف نبات أذن الفأر المطفرة بمادة EMS لهذه التقنية قد أدى إلى تشخيص عشر طفرات مختلفة بمعدل kb واحدة من منطقة التتابع المستهدفة، وان ما نسبته واحد إلى اثنين بالمائة من هذه الطفرات قد أنهت وظيفة الجين بشكل كامل . أما المجتمع المطفر بطريقة T-DNA فمن الضروري أن يكون حجم المجتمع اكبر بثلاثين مرة من الحجم الذي سبق ذكره وذلك لتشخيص أليل أو أليلين. إن الحد الأعلى لتكرار الطفرة ضمن أي مجتمع يتحدد بشكل كبير من قبل التأثيرات المتراكمة لطفرات الحذف التي تحدد كلاً من الحيوية ودرجة الخصوبة [73]. تم توضيح تكرارات تحفيز الطفرات بواسطة EMS في عدد من الأنواع النباتية ثنائية التضاعف مثل نبات أذن الفأر [20] والشعير [7]..وغيرها (جدول 1).

جدول 1. تكرار الطفرات المستحدثة بمادة EMS (ومواد مطفرة أخرى) في بعض أجناس النباتات وذبابة الفاكهة.

نوع الكائـــــــــن الحي	الطفرة: 1kb / للفرد	المصـــــــــــــــــدر
نبات أذن الفأر	0.27 x 10-5 (deletion) (25 genes, 52,000 ind.)	Li واخرون [31]
نبات أذن الفأر	0.55 x 10-5 (insertion) (whole genome, 127,706 ind.)	Alonso وآخرون [2]
نبات أذن الفأر	328 x 10-5 (point mutation) (125 genes; 3000 ind.)	Greene وآخرون [20]
الشعير	175 x 10-5 (point mutation) (2 genes; 4608 ind.)	Caldwell وآخرون [7]
الذرة الصفراء	255 x 10-5 (point mutation) (11 genes; 750 ind.)	Till وآخرون [66]
حنطة المكرونة	2466 x 10-5 (point mutation) (2 genes; 768 ind.)	Slade وآخرون [55]
حنطة الخبز	5084 x 10-5 (point mutation) (2 genes; 1152 ind.)	Slade وآخرون [55]
ذبابة الفاكهة	730 x 10-5 (point mutation) (3 genes; 2086 ind.)	Draper وآخرون [13]

إن كلاً من التباين الجيني والانعزال الذي ينتج عن ا لتلقيح ألخلطي يمكن أن يقلل من تأثير طفرات الحذف " المؤذية" لذا فبالإمكان زيادة تكرار الطفرة في الأنواع الرباعية والسداسية التضاعف، أو بإجراء التلقيح ألخلطي بعد التطفير . لقد ثبت فعلاً صحة هذا الاستنتاج من خلال دراسة أعدها Slade وآخرون [55]، التي ظهر فيها أن الحنطة السداسية تمتلك تكراراً أعلى لحدوث الطفرة مقارنة بنبات أذن الفأر والشعير، وحيث إن كل فرد ضمن ذلك المجتمع ربما يمتلك خمسمائة طفرة واضحة في جينومه، فقد أصبح لزاماً إجراء التضريب الرجعي وتحليل الانعزال للتخلص من الطفرات

السابقة غير المرغوبة، وتحديد في ما إذا كان التركيب المظهري المشخص يرجع إلى الطفرة في الجين المستهدف أم لا.

تشخيص الطفرات في المجتمعات الطبيعية (أكوتِلِنك):

قد تحدث تغيرات وراثية ذات قيمة كبيرة بين أفراد النوع الواحد نتيجة الطفرات التلقائية. إن الغالبية العظمى من هذه التغايرات تعود إلى تغير في نوكليتايد واحدة الذي يدعى عادةً تعدد أشكال النوكليتايد البسيط (Simple Nucleotide Polymorphism). تحظى هذه الطفرات الطبيعية باهتمام كبير من قبل المختصين لأهميتها واستخدامها كمعلمات وراثية في رسم الخرائط الوراثية لمختلف الأنواع النباتية وتربية وتصنيف التراكيب الوراثية، فضلاً عن أهميتها في توفير المعلومات المتعلقة بتركيب الجين والمجتمع النباتي والتكيف [47].

تم تطوير عدد من التقنيات لتشخيص SNPs. يعمل بعض هذه التقنيات على تشخيص الاختلافات في بناء أو فك حلزنة شريط DNA المفرد، وتنتج هذه الاختلافات من تغير تتابع النوكليتايد، إلا أن مثل هذه التقنيات قد فشلت في تحديد عدد ومواقع هذه الطفرات ضمن قطعة DNA التي تم فحصها [12]. لذا فمن الضروري أن تتبع عملية التشخيص عملية تحديد التتابع للتمييز بين مختلف حالات تعدد الأشكال. إن أكثر الطرائق المباشرة في تحديد التتابع ذات كلفة باهظة، خصوصاً إذا ما طبقت على عدة مواقع جينية لعدد كبير من الأفراد. تبرز أهمية **(تِلِنك)** في كونها طريقة بديلة في تحديد SNPs التي تحدث بصورة تلقائية في المجتمعات الكبيرة، كما إنها متينة وذات كلفة منخفضة، وقد اصطلح على هذا الدور (ECOTILLING) [10]. تتضمن الاخيرة عملية عزل DNA الجينوم من أفراد تقع ضمن مجتمع واحد أو عدة مجتمعات. كما هو الحال في **(تِلِنك)**، يعد من الضروري تجميع DNA جينومات عدد من الأفراد لتوفير الفرصة لتشخيص SNPs المتماثلة التركيب الوراثي.

على أية حال، عندما يختلف اغلب الأفراد فيما بينهم ضمن المجتمع الواحد في زوج واحد أو أكثر من القواعد في أي تتابع مستهدف، فان تجميع ثمان طيات (التي تعتمدها تقنية الطريقة) سوف يعقد عملية تصنيف التراكيب الوراثية، لذلك يعمد المختصون في حالة الأنواع الشديدة التباين الوراثي إلى تجميع DNA جينوم كل فرد مع DNA جينوم الفرد المصدر، إذ يتم فيه تحديد التتابع المستهدف. كما يتم تحديد المواقع الجينية المتباينة من خلال تطبيق تقنية **(أكوتِلِنك)** على DNA منفصل لكل فرد. يمكن من خلال تقنية **(أكوتِلِنك)** تحديد العدد والموقع النسبي لجميع SNPs، ومن ضمنها الطفرات النقطية وطفرات الحذف أو الحشر الصغيرة التي تحدث في التتابع المستهدف. لذا يمكن تحديد كل من التغاير الطبيعي والمستحدث في المجتمعات النباتية. إذا كان المطلوب هو معرفة التغيرات في نوكليتايد معين، فمن الضروري تحديد تتابع DNA بعد استخدام **(أكوتِلِنك)**. بما أن عدد التراكيب الوراثية المختلفة سيكون اقل بكثير من عدد الأفراد الذين يتم إخضاعهم للفحص، لذا سيكون المطلوب تجميع DNA عدد قليل فقط من الأفراد الذين سيمثلون العينة اللازمة لعزل وتصنيف التراكيب الوراثية، مما سيقلل من تكلفة تشخيص SNP. استخدمت تقنية **(أكوتِلِنك)** بكفاءة عالية في الكشف عن SNPs في مجتمعات نبات أذن الفأر [10] وتحت مجتمع نبات (*Populus trichocarpa*) [18]، إذ وجد في كلا الدراستين أن هذه الطريقة كانت سريعة وفعالة في الكشف عن SNPs المستهدفة، ولعل أهم ما يميز الدراستين أن الأولى ضمت نباتاً ذاتي التلقيح وحولي وذي جينوم صغير، في حين ضمت الدراسة الثانية نباتاً خلطي التلقيح ومعمر وذي جينوم كبير نسبياً، مما يدلل على شمولية تقنية **(أكوتِلِنك)** وإعطائها نتائج جيدة على الرغم من اختلاف حجم الجينوم المستخدم في الدراستين.

كيفية اشتغال (تِلِنك):

أسهمت النجاحات الهائلة لتقنيات تحديد تتابع DNA التي تتم بالأتمتة في استمرار هيمنة هذا النوع من التقنيات في بحوث الجينوم، و يبدو أن هذا سوف يستمر لمدة طويلة. إن استبدال تقنية محددات التتابع على الهلام (gel-based sequencers) بمحددات التتابع الشعرية (Capillary sequencers)، أزال آخر عائق كان يعترض انجاز تحديد التتابع المؤتمت، وساهم ذلك في رسم الخارطة الوراثية شبه الكاملة للإنسان [70,30].

استخدم في طريقة (**تِلِنك**) الأصلية جهاز فك الحلزنة HPLC (DHPLC) للبحث عن الطفرات، إلا إن الاعتقاد السائد كان عدم إمكانية تطبيق هذه الطريقة بسهولة . لذا فقد جرت عدة محاولات للبحث عن تقنيات بديلة. بدت طريقة الانشطار الإنزيمي غير المطابق (Enzymatic Mismatch Cleavage) التي وضعت من قبل Tony Yeung ملائمة جداً [48]، واستمرت المحاولات لتطوير هذه التقنية للإنتاج العالي. لقد وجد أن نظام تحليل الهلام مناسب لهذا التطبيق [39]. وضع الحجر الأساس لبرنامج عمل متكامل في عام 2001 لتطبيق (**تِلِنك**) في مجتمعات مطفرة من نباتات أذن الفأر، فضلاً عن إعداد البرامجيات الضرورية لهذا الغرض[9]. تبدأ أولى خطوات (**تِلِنك**) بمعاملة البذور بمادة (EMS)و تلقيح نباتات (M1) منها ذاتياً. تستخدم نباتات فردية من الجيل الثاني (M2) لتحضير عينات DNA للبحث عن الطفرات (شكل 1). يتم تجميع عينات DNA وترتب بشكل صفوف دقيقة جداً في أطباق (Microtiter). تتم مضاعفة نسخ هذه التجمعات باستخدام بوادئ جينية متخصصة (Gene-specific primer) . تحدد المنتجات المضخمة بواسطة إنزيم (CEL I endonuclease) وهو أحد أفراد عائلة (S1 nuclease) المتخصصة بشريط مفرد[48] . يتسبب CEL I بإحداث شقوق على ثلاثة جوانب من المادة المدروسة، وتكوّن حلقة إلى الخارج في الشريط المزدوج بين الأنواع البرية و DNA الطافر، في حين تترك الأشرطة في حالة تماس مع بعضها . يستخدم نظام تحليل الهلام لترحيل المواد الناتجة من التشقق كهربائياً، كما يستخدم برنامج لمعالجة الصور مثل (Adobe Photoshop; Adobe Systems; Mountain View) لتفحص ما أعطته قراءة الهلام. إن الاختلاف في تعليم نهايات الشريط المزدوج للنواتج التي ضوعف عدد النسخ فيها يسمح بتفحص سريع ودقيق، وذلك لأن الطفرات يتم تحديدها على الأشرطة المكملة ولهذا يمكن تمييزها بسهولة عن تلك المنتجات التي تمت مضاعفة النسخ فيها يدوياً (آلياً).

اعتماداً على تحديد الطفرات في التجمعات الجينية، يتم تفحص عينات DNA بصورة مماثلة لتحديد الفرد الحامل للطفرة . إن هذا الفحص الدقيق والسريع يحدد من خلاله موقع الطفرة ضمن مدى من ازواج القواعد (±10 bp) لمنتجات PCR يصل حجمها إلى واحد kb ، فقد وجد Greene وآخرون[20] إن معدل حدوث الطفرة كان بنسبة واحد لكل 235 kb، أي حوالي أربع طفرات نقطية لكل ثمان طيات من الهلام.

إن احد أهم فوائد (**تِلِنك**) ذات الإنتاجية العالية إذا ما قورنت مع الطرائق المنافسة الأخرى، هو أن تحديد الموقع التقريبي لكل طفرة مشخصة مستنتجة من حجم قطعة DNA وهذا يسهل كثيراً من عملية تحديد التتابع . فضلاً عن ذلك فأن طريقة تعليم النهاية المزدوجة (Double-end labeling strategy) تضيف درجة كبيرة من الدقة إلى عملية تفحص التجمعات الجينية، كما يمكن الحصول على المزيد من الدقة من خلال تشخيص نفس القطعة في الأفراد التي تم تعقبها. لذلك فأن عملية تحديد التتابع تنجز بدقة ويمكن البت بشكل قطعي فيما إذا كانت الطفر ة موجودة أم لا في مدد قصيرة. إن نقص التتابع للهلام في المواقع المتوقعة كافٍ لتحديد القواعد الطافرة والبديلة، وتستخدم عدة برامجيات لتسهيل هذه الخطوة منها Gene Codes و Ann Arbor و MI، وقد تم تحديد أكثر من ثلاثة آلاف طفرة في نباتات أذن الفأر باستخدام هذه الطريقة. تستخدم عادة القراءات من الشريط الذي يكون فيه البادئ أقرب إلى الطفرة المشخصة، وعلى سبيل المثال ففي الطرائق التي لا توفر مواقع تقريبية للطفرات المشخصة مثل DHPLC فان القطعة التي ضوعف عدد نسخها كلياً يجب أن تكمل من خلال تحديد التتابع فيها، إذ تتطلب قطعة بحجم واحد kb عدة دورات من التفحص الدقيق . إن تشخيص الطفرات في الفرد المتباين التركيب الوراثي في مثل هذه الحالة يصبح صعباً جداً، خصوصاً إذا كانت ارتفاعات القمة متباينة كما أن ايجابيات الخطأ (False positives) ستزيد من تعقيد هذه المشكلة.

خطوات تطبيق (تِلِنك) و(أكوتِلِنك) في الأنواع الجديدة:

1 -تهيئة المجتمع :

إن إنتاج مجتمع طافر وملائم (**لتلنك**) يتطلب التعامل بحذر مع عدة عوامل بضمنها التركيب الوراثي للمجتمع المستهدف واختيار المادة المطفرة وطريقة العمل وطريقة

جمع العينات ونوعية وطريقة إعداد DNA وطريقة تجميع الجينات (Pooling) (شكل 1). يمكن أن يكون التركيب الوراثي سهلاً إذا كان المجتمع عالي التماثل الوراثي، كما أن الأنواع الذاتية التلقيح مهمة جداً . إن عدم التماثل الوراثي يكون معقداً، ولكنه لا يشكل مانعاً لا يمكن تجاوزه[76,55,13]. لتقليل التباين الوراثي إلى أدنى حد ممكن قد يستلزم اختيار أب مفرد " أو أقل ما يمكن" ثم يتم إنتاج عدة آلاف من أفراد النسل منها في جيل واحد أو عدة أجيال. كما يجب أن يتم اختيار السلالة التي تتوفر فيها معلومات كافية عن تتابع الجينات. يفضل اختيار المطفر الذي يتمتع بكفاءة عالية في إحداث طفرات نقطية، و من بين هذه المطفرات العناصر القاعدية وأهمها وأكثرها استعمالاً لهذا الغرض هو (EMS) وهو شائع الاستعمال بسبب توفره ومقدرته على إحداث الطفرات النقطية بكثافة عالية . إن معاملات التطفير التي تتسبب في طفرات الحذف، عادةً ما ينتج عنها عدد قليل من التغيرات في الجينوم الواحد، وهي غير ملائمة لاختبارات (**تِلِنك**) لأنها تتطلب حجماً كبيراً للمجتمع ولا ينتج منه سوى عدد قليل من طفرات الحذف التي يمكن تشخيصها بسهولة بواسطة تحليل CEL I [10] ولكنها غير معلومة [32]. هناك طريقة أخرى للتطفير لم يتم استخدامها في (**تِلِنك**) بعد، وهي طفرات تسبب إعاقة تضاعف أو إعادة ازدواج شريط DNA المزدوج وهي فعّالة جداً في البكتريا ، ومن المؤمل أن تكون بنفس الكفاءة لدى استخدامها في بحوث الكائنات الحقيقية النواة [61,19]. إن شدة التطفير التي سيتم إخضاع الجينوم المستهدف لها تعد احد أهم مكونات هذه التقنية. إن احد أهم العوامل التي تؤثر في الناتج النهائي هو طبيعة التعديل الوراثي الذي اخضع له الكائن الحي والذي قد ينتج عنه معاملات مماثلة تنتج اختلافات واسعة في كثافة الطفرات في مختلف الأنواع. يتم التطفير عادةً بأسلوب يتسبب في مستوى معين من الهلاكات للكائن الحي في مراحل عمرية معينة" البذرة مثلاً"، في حين يسمح بمستويات كافية من الخصوبة في ذات الوقت، فنبات أذن الفأر يمكن تطفيره بمستويات مقنعة "قد تصل إلى طفرة واحدة لكل 170 kb من DNA " بدون حدوث هلاكات كبيرة في البذور المعاملة. كما يتم تطفير الرز(*Oryza sativa*) لإنتاج حوالي 50% من البذور الميتة وهذا يقود إلى انخفاض كثافة الطفرات الناتجة بشكل كبير (طفرة واحدة لكل Mb من DNA) [78]، كما وجدت نتائج مماثلة أيضاً في الشعير [7]. بسبب كون جميع هذه الكائنات ثنائية التضاعف يبدو منطقياً أن هناك اختلافات وظيفية تنتج عن تحسين التحسس في بعض الأنواع أو الأجناس الذي يسببه التأثير المميت للعناصر القاعدية.

إن أعلى كثافة للطفرة قد تم الحصول عليها في الحنطة السداسية هي بمعدل طفرة واحدة لكل 25 kb من DNA تليها الحنطة الرباعية بمعدل طفرة واحدة لكل 40 kb [55] ثم تليها ذبابة الفاكهة بمعدل طفرة واحدة لكل 150 kb [77] ونبات أذن الفأر طفرة لكل 170 kb [20] واسماك حمار الوحش بمعدل طفرة لكل 230 kb إلى طفرة لكل 500 kb [76,13] والذرة الصفراء والرز بمعدل طفرة لكل 500 kb [78,66,65] والشعير بمعدل طفرة لكل Mb [7]. يتضح من هذه البيانات أن هناك دوراً محتملاً لمستوى التضاعف وليس حجم الجينوم. عموماً فان المعلومات على المستوى الجزيئي للاختلافات في الاستجابة للعوامل المطفرة بين مختلف أنواع النباتات تكاد تكون نادرة في حين إنها ذات فائدة كبيرة في تطوير مجتمعات هذه التقنية، وهذا ما لم ينتبه له المختصون بالوراثة والوراثة الجزيئية في العقدين الماضيين.

تعد طريقة التطفير إحدى الخطوات الحرجة التي تؤثر في طريقة جمع العينات من المجتمع المطفر . تتم عملية التطفير عادة بنقع البذور بمحلول المادة المطفرة، وتستهدف هذه الطريقة جينومي كلا الأبوين. قد تعتمد طريقة أخرى لاستثمار الوقت وهي معاملة حبوب اللقاح كما في الذرة الصفراء [66,65] . يمكن إجراء عملية تطفير كفوءة لبذور النبات باستخدام مادة EMS وذلك بنقع البذور بمحلول هذه المادة فزراعتها. إن الظروف النموذجية لعملية التطفير تتضمن النقع لمدة 14 إلى 18 ساعة في 30 إلى 100 مل من محلول EMS بتركيز(0.3 % إلى 1%). تعتمد الظروف المثالية على عدد من المتغيرات، لذلك يجب أن تحدد هذه الظروف تبعاً للنوع [4]. تزرع بذور النباتات المعاملة(M1) وتنمى وتتخذ الإجراءات اللازمة لضمان

التلقيح الذاتي وتستمر بالنمو حتى النضج لإنتاج بذور M2. أما النباتات التي لا يمكن إجراء التلقيح الذاتي فيها بكفاءة أو أنها تعاني من انحدار وراثي شديد، ربما يكون من الضروري أن تلقح خلطياً مع أب غير مطفر، أو أن يتم تطفير حبوب اللقاح وليس البذور كما هو الحال مع الذرة الصفراء [66]. يمكن الإبقاء على بذور M2 كسلالات، كما يمكن أن تخلط سوياً. إذا تم خلط بذور M2، عندها يجب أن تنتج السلالات من الجيل الثالث (M3) وذلك بحصد نباتات فردية منه وفي كلتا الحالتين يجب الانتباه عند اخذ العينات من نباتات M2 لتكوين المجتمع الخاص بتقنية (**تِلِنك**) إلى ضرورة أن يكون عدد السلالات المأخوذة من نفس الأب في الجيل الأول (M1) قليلة قدر الإمكان. يتم جمع الأوراق لأخذ عينا ت DNA الجينوم، كما تحصد بذور الجيل الثالث من نباتات M2. بالاعتماد على تكرار الطفرة بعد استخدام EMS، فان حجم المجتمع المطلوب سيكون اقل من عشرة آلاف نبات في الجيل الثاني، ولأجل زيادة التغاير الوراثي يجب أن يكون حجم مجتمعM1 عالياً نسبياً (عشرة آلاف فرد)، أما إذا كان عدد البذور في النبات الواحد منخفضاً فمن المحتمل أن لا يكون هناك عدد كافٍ من بذور M3 لإتمام عملية التوزيع. في مثل هذه الحالة يمكن اللجوء إلى زيادة بذور السلالة الواحدة بزراعة عدد اكبر من بذور M3 وتنمية نباتاتها لإنتاج نباتات M4 التي تخلط مع بعضها البعض.

لا يمكن استخدام الأفراد الناتجة عن عملية التطفير (M1) في (**تِلِنك**) وذلك لأنها (chimeric) وإنما يجب استخدامها لإنتاج M2 بينما يمكن إنتاج أفراد M1 من خلال تلقيحها بحبوب لقاح تكونت على نباتات طافرة، وان أياً من خلايا الزيجة يمكن إخضاعها لتقنية (**تِلِنك**) [60]. هذا وبالرغم من أن الطفرة لا يمكن إحداثها إلا في الجينوم فقط، إلا انه يمكن أن تؤخذ العينات من جميع خلاياها، بينما ستفقد 25% من الطفرات المستحثة في البذور المعاملة خلال الانقسام الاختزالي الذي يحدث في M1 لإنتاج M2 . إن عدد الطفرات التي يمكن أن تجمع العينات منها في أفراد M2 التي أنتجت من بذور M1 هو أكبر بمقدار 50% من بذور M1 التي أنتجت من حبوب اللقاح الطافرة. فضلاً عن ذلك وبسبب كون جميع الأفراد التي أنتجت مؤخراً هي متباينة (Heterozygous) للطفرات، فان العائلات التي أنتجت من التلقيح الذاتي سوف تنعزل دائماً لأية صفة طافرة مما يسهل من عملية التحليل الوراثي. إن جمع عينات DNA يفضل أن يتم في M2 من المجتمعات التي تعامل فيها البذور وأن يتم في أفراد M1 في المجتمعات التي تعامل فيها حبوب اللقاح. عادةً ما يستخدم نبات أذن الفأر في تجارب (**تِلِنك**) ضمن مجتمعات تتألف من 3000 فرد خصب من M2، إلا أن المجتمع المستهدف سيتغير تبعاً لتغير النوع وهذا يعتمد بشكل رئيسي على معدل الطفرة . إن مصادر المجتمع يمكن أن تكون ذات قيمة أكبر إذا ما توفرت معلومات عن الأشكال المظهرية [78,38]. عادةً يكون من الأفضل من الناحية العملية إجراء اختبار على مجتمع صغير قبل إخضاعه لبرنامج (**تِلِنك**) وهذا يتم من خلال إجراء تجربة تضم حوالي 800 فرد والعمل على استهداف خمسة أو أكثر من الجينات. كما يجب أن تكون العينات معزولة عن بعضها البعض لتجنب إعادة أخذ عينات من نفس الكروموسومات الطافرة. يمكن انجاز ذلك بعزل كل فرد من أفراد M2 عن كل M1، وإذا لم تتوفر أفراد M2 فيمكن جمع العينات من أفراد M3، وذلك بأخذ عدة أفراد لتجميع جيناتها وبالتالي إعادة تشكيل التركيب الوراثي لآبائها. تتطلب هذه الطريقة عملية موازنة دقيقة لتجنب تقليص التركيبة الوراثية للآباء لدى إعادة تمثيلها.

إن نقاوة DNA الذي تم إعداده تعد من الأمور المهمة أيضاً، وDNA الملائم لإجراء (**التِلِنك**) يتميز عادةً بمعدل حجم جيد (15 kb) على الأقل، وان يكون مستقراً تحت ظروف الخزن القياسية. فضلاً عن ذلك، فقد وجد من خلال العديد من التجارب أن هذه المعايير لا يمكن إدراكها في جميع حالات إعداد وتهيئة DNA، كما لن تكون ملائمة لإجراء هذه التقنية فيها. ففي بعض الحالات يتم الحصول على معدلٍ عالٍ من منتجات PCR المجهولة، وهذا يقلل من كفاءة العملية بشكل عام، لذا فمن الضروري اختبار دقة كل تقنية من تقنيات تهيئة وفحص DNA المتبع في برنامج (**تلنك**).

إن التقدم الحاصل في تطبيق بحوث الجينوم، مثل تطوير المقدرة على تحديد SNP أو تحديد التتابع في الجينوم

سيجعل من (**تِلِنك**) أسهل وابسط، إذ نجد أن ما يعرف بإعادة التتابع (Resequencing) يشكل تقدماً مهماً يخدم تطبيق هذه التقنية. كما أن التحسن الكبير في تطوير كفاءة تحديد التتابع سيقلل من تكلفة التقنية المستخدمة. قد لا يمكن استخدام عدد من التقنيات التي استحدثت مؤخراً والفعّالة جداً في تطبيقات (**تِلِنك**)، إذ أن التطور الذي يسمح بتحديد التتابع بدقة وكفاءة عاليتين للجينوم العشوائي أو (cDNA) ، ربما لن يلبي متطلبات الدقة العالية في إعادة التتابع لنفس القطعة من DNA في آلاف الأفراد، مما يستدعي إجراء بعض التحويرات على مثل هذه الطرائق [53,33]. ربما سيكون من الممكن في المستقبل القريب تحديد التتابع الكامل لجينات أي فرد بتكلفة منخفضة بحيث يمكن تحديد جميع الطفرات في مناطق تشفير البروتين لبضعة آلاف من الأفراد المطفرة، وحينذاك ستصبح (**تِلِنك**) عملية (in silico) التي تستخدم بيانات شاملة في تحديد تتابع الجينات لتشخيص التغاير الملائم في الكائن الذي سيتم اختياره، وأخيراً فان التقدم في استخدام المواد المطفرة سيساهم بشكل كبير في رفع كفاءة اس تخدام الطريقة في مختلف الكائنات الحية من خلال السماح بإنتاج مجتمع من الأفراد التي تُظهر طفرات بنسب عالية.

2 -تجزئة المجتمع إلى صفوف دقيقة

لقد تم تعديل برنامج عمل (**تِلِنك**) إلى (96-Well format) لتسهيل الإنتاج العالي [63]. يعزل DNA الجينومي من النباتات ويقسم إلى صفوف دقيقة على أطباق (Microtiter). تؤثر نوعية DNA الجينومي كثيراً في نتائج التقنية ومدة صلاحية العينات. لذلك فأن برامج العمل المستخدمة في عزل DNA التي تنتج عينات منه بنقاوة ونوعية عاليتين تستحق الوقت والمال الإضافيين اللازمين، ففي برنامج العمل المتبع حالياً يمكن تشخيص تتابع DNA الطافر المفرد من بين خمسة عشر أخرى اعتيادية (ليس فيها طفرة)، وهذا يسمح بزيادة عدد الطيات (Folds) إلى ثمان مجاميع لكل عينة في الأنواع الثنائية المجموعة الكروموسومية وبالتالي زيادة كفاءة التقنية.

يتم عادةً تجميع عينات DNA الجينومي من ثمانية أطباق في الطاقم (96-Well microtiter) لإنتاج طبق يضم عينات DNA من 768 نباتاً (بحسب حاصل ضرب طبيعة الصفوف والأعمدة للطريقة وهي (96 x 8) التي ستستخدم في دورة (**تِلِنك**) الأولى. عند تجميع العينات يجب تطبيع DNA الجينومي للأفراد للتأكد من التمثيل المتساوي للعينات في المجموعة. أما في حالة الأنواع المتعددة التضاعف ذات التتابع المعطل العالي، فان مضاعفة عدة نسخ من التتابع المستهدف ربما يقلل نسبة تعدد أشكال التتابع إلى أدنى من حد عتبة الانطلاق (1.16)، وهذا يزيد من صعوبة تشخيصها. يمكن حل هذه المشكلة إما من خلال تقليل حجم المجموعة، أو بإعادة تصميم بوادئ PCR لجعل عملية مضاعفة النسخ مقتصرة على زوج معين من الجينات المتماثلة.

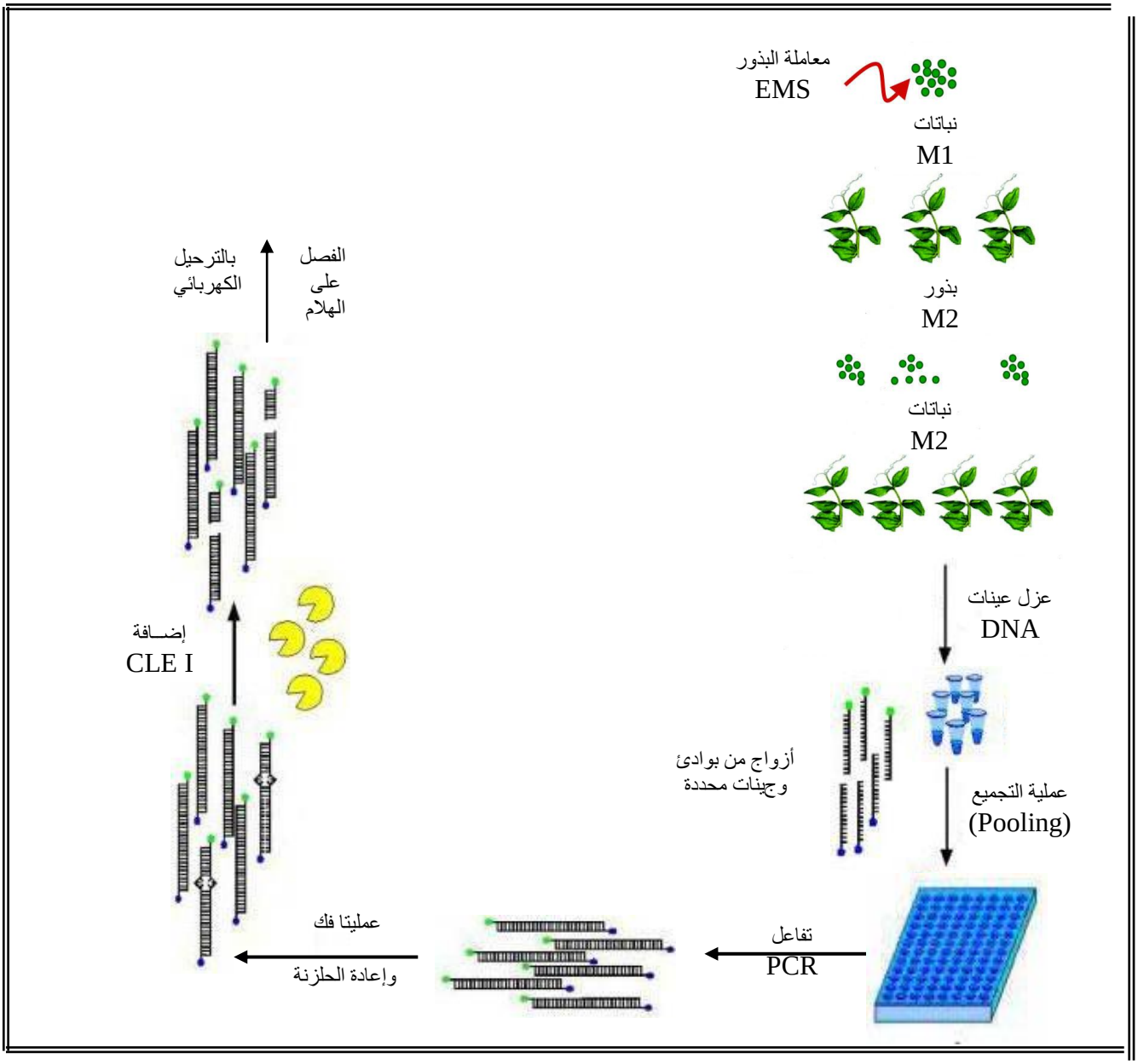
3 -اختيار التتابع المستهدف

يبلغ الطول المثالي للتتابع المستهدف الذي يمكن إخضاعه (**لتِلِنك**) في تفاعل واحد حوالي 1.5 kb من القواعد، إلا أن اغلب الكائنات الحية يبلغ طول تتابع جيناتها أكثر من 2 kb من القواعد وقد يتجاوز هذا الطول في أحوال عديدة، مما يستدعي اللجوء إلى عدد من الخيارات الأخرى التي تأخذ بنظر الاعتبار نسبة الجينات التي سيتم استهدافها . طالما أن الهدف من إجراء (**تِلِنك**) هو تشخيص الطفرات في الجينات المستهدفة، وان اغلب الطفرات تحدث في التتابعات غير المشفرة (Non-coding sequences) مثل (introns) والمناطق غير المترجمة، ولن يكون للمحفزات تأثير يذكر على وظيفة الجين، لذا يجب اختيار التتابع المستهدف لتقليل مثل تلك التتابعات ولزيادة حجم مناطق التشفير، وكما تم ذكره سابقاً فأن أكثر من 50% من الطفرات ضمن منطقة التشفير سوف لن يكون لها تأثير على وظيفة الجين [67]. يزداد احتمال إيجاد طفرات ضارة من خلال اختيار مناطق تشفير ضمن المنطقة المستهدفة التي تشفر المناطق المحافظة (Conserved domains) ويمكن التعرف على مثل هذه المناطق من خلال المقارنة مع الجينات المماثلة لكائنات أخرى . تمت الاستعانة ببرنامج (CODDLE) [64]، للمساعدة في اختيار التتابع المستهدف لتطبيق (**تِلِنك**). يُنشئ هذا البرنامج نماذج (exon-intron) للجين من تتابع الجينوم الموضوع تحت الدراسة ومعلومات التشفير، يتم بعدها التعرف على

المناطق المحافظة من الجين حيث يزداد احتمال أن تكون الطفرة مؤثرة في وظيفة الجين . يستخدم (CODDLE) برنامج (Primer-3) لتصميم البوادئ التي ستضاعف نسخ التتابع المرغوب[52]. أما في حالة الأنواع البرية، فأن اختيار التتابع المستهدف سيكون استناداً إلى معايير أخرى. إذ لن يكون الهدف الرئيسي من التقنية هو التعرف على الاليلات الضارة، فقد يعمد الباحث إلى زيادة تتابع (intron) وتقليل المناطق المحافظة، وذلك لزيادة فرص العثور على حالات تعدد الأشكال الطبيعي (Natural polymorphism).

نواتج (تِلِنك)

يتم التعرف من خلال التقنية على النباتات الفردية التي تمتلك طفرات في مواقع معلومة من الجينات المستهدفة، فإذا وجد أن الجيل الثاني هو متباين التركيب الوراثي بالنسبة للطفرة فيجب عندها تشخيص نباتات الجيل الثالث المتماثلة التركيب الوراثي قبل بدء التلقيح فيها . عادةً يدخر الباحث الوقت من خلال متابعة الطفرات التي يمكن أن تحدث في التراكيب المظهرية . إن حدوث طفرات (nonsense) أو التقاء الوصلات (splice-junction) تكون مضرة في اغلب الأحيان، في حين لن تكون طفرات (missense) كذلك . يمكن التنبؤ في احتمال أن تكون أي من طفرات (missense) ضارة من خلال التبدل الحاصل في حامض أميني معين. بسبب كون كل نبات مطفر يمكن أن يمتلك مائتي طفرة منتشرة على امتداد الجينوم، بل وحتى الطفرات الضارة التي قد لا تنتج أشكالاً مظهرية جديدة نتيجة الانعزال، لذا فمن الضروري التأكد من تشخيص المظاهر الناتجة من تلك الطفرة الت ي حددت معالمها بالطريقة. إن أكثر من أليل واحد ضار في الجين المستهدف سيتسبب بظهور نفس التركيب المظهري . يمكن أيضاً تضريب الأفراد الطافرة رجعياً مع النوع البري لتحديد الطفرة من الانعزالات التي تحصل في الجيل الثاني . يمكن تشخيص الطفرة في أفراد الجيل الثاني باستخدام **(تِلِنك)**، أو بتطوير واستخدام معلمات (CAPS) أو(dCAPS) لإجراء هذا الفحص [45,44,27]. إن الانعزال لا ينهي احتمال أن يكون الشكل المظهري ناجماً عن الطفرة في جين منفصل قريب جداً من الجين المستهدف، لذا يجب أن يُتخذ عدد من الخطوات للتأكد من ذلك . أما تكامل شكل المظهر الطافر من خلال انتقال المعلومات بينه وبين الجين المستهدف فيمثل طريقة أخرى لربط الشكل المظهري بالجين المستهدف.



شكل 1. أهم الخطوات المتبعة في تطبيق (تِلِنك).

مستلزمات تنفيذ (تِلِنك):

تعتمد إمكانية تطبيق **(تِلِنك)** من عدمها على حجم الإنتاج المخطط له وعلى مدى توفر المستلزمات اللازمة لاستخدام هذه التقنية بكفاءة . لا توجد قائمة موحدة للأدوات الضرورية لتطبيق التقنية المذكورة، إذ تختلف الأدوات المستخدمة في **(تِلِنك)** من مختبر لآخر، إلا أن هناك أدوات أساسية لا غنى لأي مختبر عنها إذا أراد أن تطبق فيه هذه التقنية . هناك العديد من الأنظمة المستخدمة في الكشف عن المستوى المتدني من الطفرات أو تعدد أشكال الجين وبعض هذه الأنظمة متوفر بشكل طقم (Kit)، ومنها المستخدمة في هندسة الجينوم المعروفة تجارياً باسم (Surveyor) التي تتضمن استخدام الانشطار غير المطابق (Mismatch cleavage) بواسطة CEL I لتشخيص الطفرات في قطع شريط DNA المزدوج باستخدام تحليل الهلام [51]. إن هذا النوع من اللوازم وجميع الخاصة منها بتشخيص الطفرات يمكن أن تطبق في مشاريع الإ نتاج بمستوى واطئ، مثل البحث عن الطفرات وتعدد أشكال الجين في جينات مفردة فقط. عموماً، يجب أن تكون تكلفة تلك اللوازم منافسة لتكلفة تحديد التتابع الكامل لتزيد من فرص تحديد تتابع DNA ويصبح في متناول الجميع . عندما يصل عدد

الجينات المستهدفة وحجم المجتمع إلى النقطة التي يكون عندها استخدام تلك اللوازم أو تحديد التتابع الكامل مكلفاً جداً أو غير عملي، حينها سيكون استخدام (**تِلِنك**) مجدياً [17] . عند هذه النقطة تحديداً يثار التساؤل التالي : ما هي طبيعة اللوازم المطلوب توفرها لتطبيق (**تِلِنك**)؟.

يتوفر في مختبرات البايولوجي الجزيئي النموذجية العديد من الأدوات مثل PCR و(Heating blocks)، في حين قد لا تتوفر بسهولة إمكانية تحليل هلام (Polyacrylamide) آلياً. فإذا توفرت أدوات (Gel-running) الملائمة في المختبرات المجهزة جيداً، عندها سيكون خيار استخدام (**تِلِنك**) مغرياً، لأنها سوف ل ن تتطلب أدوات أساسية [18]. إن اغلب الكواشف الضرورية لتطبيق التقنية متوفر بشكل دوري . عموماً، فقد أصبح إنزيم CEL I المستخدم في الانشطار المنوه عنه متوفراً بشكل تجاري في أواخر عام 2003 عندما بدأ تسويق لوازم (Surveyor) [51]، وقد ازداد الطلب مؤخراً على إنزيم (CEL I endonuclease) الذي تمت تنقيته ليستخدم في طريقة Anthony Yeung وآخرون [79] بعد إجراء بعض التحويرات عليها من قبل Comia و Henikoff [11]. قام Yenng وآخرون [79] بتنقية الإنزيم ليصبح جاهزاً للاستخدام من قبل العديد من المختصين الذين يرغبون بإجراء (**تِلِنك**) بأنفسهم. إن كلاً من مستخلص الكرفس و وإنزيم Nuclease الماش المتوفر بشكل تجاري يمكن أن يكونا مصدراً لإنزيمات الانشطار [66,65]. تبين من خلال دراسة Comia و Henikoff [11] إمكانية استخدام طيف واسع من المصادر التجارية والمحلية للإنزيمات في (**تِلِنك**)، وليس بالضرورة أن يشمل هذا جميع التطبيقات المسجلة لهذه الإنزيمات، مثل انشطار الشريط المزدوج (Double-stranded cleavage) [57]. يعد جهاز شركة (LI-COR) نظام تحليل الهلام مع جهاز (96-well format) ملائمين جداً في تطبيق (**تِلِنك**) وذلك لحساسية المشخص الليزري لجهاز شركة (LI-COR) [63,9]. على أي حال، فان إمكانية توفير كل من الوقت والمال نتيجة استخدام نظام تشخيص شعري (Capillary) يجعل من الضروري تطوير هذه الطريقة في المستقبل . يمكن شراء إنزيم (CEL I endonuclease) إذ انه متوفر تجارياً، كما يمكن إنتاج بديله من مستخلص الكرفس الخام، وذلك بمقدار نصف كغم من الكرفس ، ثم عملية تجزئة سلفات الأمونيوم والتنافذ الغشائي (Dialysis) [65]، كما انه من الضروري توفر جهاز (PCR thermocycler) للطرد المركزي قادر على حمل الصفائح (96-well microtiter plates) وماصات متعددة القنوات (Multichannel pipets) أو جهاز (Robot liquid handler) وعدد من وسائل تنقية العينات، مثل الترسيب بالايثانول (Ethanol precipitation) أو التنقية بالسيفادكس (Sephadex purification) . كما انه من اللازم توفر نظام إدارة بيانات كفوء لتتبع مسار العينات التي أصبحت مؤخراً من الخطوات السهلة بعد إطلاق نظام (GelBuddy) وهو برنامج صمم لتسهيل تحليل بيانات بحوث (**تِلِنك**) المطبقة باستخدام معدات شركة LI-COR [80] .

إن توفر الأدوات الملائمة وإنزيمات الانشطار تساهم بشكل كبير في خفض تكاليف تطبيق (**تِلِنك**) وتصبح تقنية (**أكوتِلِنك**) منافسة لتكاليف تطبيقات PCR الأخ رى [71]. كما يمكن في بعض الحالات استخدام المجتمع المطفر الذي أنتج لغرض تفحص الشكل المظهري في (**تِلِنك**)، وهو خيار كفوء جداً [22]. تعتمد إنتاجية هذه التقنية على عدد من المتغيرات إذ تشير التقديرات المتوسطة إلى أن استخدام واحد أو اثنين من أنظمة محلل شرائح الهلا م يقوم به شخص واحد مدرب جيداً ويعمل بدوام كامل، يمكن أن ينتج ما بين 20 إلى 50 جيناً مستهدفاً أو 200 إلى 500 طفرة سنوياً. إن ستة أشهر في الأقل تعد كافية لإنشاء المختبرات وبدء التشغيل التجريبي وقد يزداد هذا الوقت إذا كان من الضروري إكثار المجتمعات. لا تعد (**تِلِنك**) منخفضة الكلفة إذا ما قورنت ببقية تقنيات الوراثة العكسية، إذ إن عدداً من المواد مثل البوادئ المتخصصة وأطباق Microtiter وجهاز LI-COR وجهاز PCR تعد ضرورية لتحديد الطفرة في هدف واحد ضمن مجتمع حجمه 3000 فرد وبثمان مجاميع تستخدم لتشخيص طفرات مختلفة ستكل ف حوالي ألف دولار (من ضمنها كلفة تحديد التتابع). أما إذا أضيفت لها كلفة العمل ألمختبري وأجور الأدوات وغيرها،

فان التكلفة سترتفع لتصل إلى ألفين وخمسمائة دولار . لازالت هناك معوقات تشكل تحدياً جدياً أمام استخدام (**تِلِنك**) بسبب عدد الخطوات الكبيرة التي تتطلبها ، ابتداءاً بتحضير العينة وانتهاءاً بتحديد تتابع الطفرة المكتشفة. بالرغم من تشابه عملية البحث الحقيقية في جميع الكائنات الحية تقريباً، إلا أن توفر المعلومات عن تتابع الجينوم ومستوى التضاعف في الكائن الحي والحجم المثالي للمجتمع، كلها عوامل محددة ومهمة يجب أخذها بنظر الاعتبار قبل التفكير بإرساء برنامج (**تِلِنك**).

تقنية المعلومات المستخدمة في تحليل نتائج (تِلِنك):

لقد تم تعديل العديد من برامج الحاسوب لتسهيل استخدام (تِلِنك). أصبحت هناك حاجة لتقييم تأثيرات الطفرات الخاطئة، سواء كان ذلك لغرض تحليل نتائج (**تِلِنك**) أو تعدد أشكال الجينات. من بين البرامج المستخدمة لهذا الغرض (Codons Optimized to Detect Deleterious Lesions) (CODDLE) الذي أصبح بمثابة الواجهة الأمامية لتقنية (**تِلِنك**) وهو متوفر بشكل مجاني [63]. إن لهذا البرنامج خيارات دخول متعددة لتحديد تتابع الجينات وللحصول على أنموذج (exon-intron) للجين قيد الدراسة باستخدام سلسلة من بنوك المعلومات العامة. طُوّر برنامج CODDLE من قبل Taylor و Greene [62] كوسيلة عامة يمكن أن تستخدم لتحليل تعدد أشكال الجينات ولتصميم بوادئ متخصصة لكل جين طافر أو لكل كائن حي . يحصل برنامج (CODDLE) على المعلومات المتعلقة بالجينوم وشفرات البروتين من مصادرها العامة، ويستخدمها لتشخيص المناطق المثالية واختيار البادئ الملائم للشروع بعملية مضاعفة النسخ (Amplification). إن امتلاك برنامج (CODDLE) لمصادر إدخال مختلفة جعله مرناً وملائماً إلى حد كبير [64]. كما يستخدم برنامج (Project Aligned Related Sequences and Evaluate SNPs) (PARSESNP)، وهو الآخر متوفر بشكل مجاني ويستخدم في تقييم الطفرات وتعدد أشكال الجين والتغير في مواقع التقييد (Restriction Sites) ومعلومات أخرى تسهل عملية تحليل الأشكال المظهرية [62]. يعد كل من برنامج (CODDLE) و (PARSESNP) متشابهين من حيث أنهما أداتان متعددتا الغرض يمكن من خلالهما تحليل معلومات الطفرة أو تعدد أشكال الجين التي لا يكون مصدرها (**تِلِنك**) أو (**أكوتِلِنك**).

مشروع (تِلِنك) في أذن الفأر:

قادت إمكانية الإنتاج العالية لتقنية (**تِلِنك**) إلى إرساء مؤسسة بحثية (ATP) متخصصة على نبات أذن الفأر [63] خصوصاً أن هناك عدة خيارات أمام الباحثين الذين يرغبون بمعرفة وظيفة الجينات التي يتم تحديد تتابعها في هذا النبات، إذ يجب أن تمر أولاً بمركز قاعدة البيانات مثل مٍعهد SALK [2]، وعلى فرض أن الباحثين قد توصلوا إلى جينات هذا النبات كي يتمكنوا من تعليمها، فأن هناك ثلاث نتائج يمكن التوصل إليها بعد تفحص التراكيب المظهرية الناتجة: أولاً: عدم وجود تراكيب مظهرية طافرة. ثانياً: الحصول على تراكيب مظهرية طافرة وحيوية. ثالثاً: الحصول تراكيب مظهرية ميتة . مما يستدعي أن يحاول الباحثون إيجاد تقنيات بديلة في الحالة الثانية. إن العلاقات في المنطقة الثالثة من الجين التي ستقلل من أدائه ستكون ذات فائدة كبيرة في التحليل الوراثي . على أية حال يبدو من المستبعد أنها ستقدم سلسلة أليلية وسيكون من الصعب جداً ترجمة العلامات الظاهرة، لذلك قد يلجأ الباحثون إلى استخدام كابح RNAi [74] الذي يتطلب جهداً كبيراً، فضلاً عن أن نتائجها غير معلومة ومتباينة جداً ولا يمكن التنبؤ بها [25,8]. في الحالات المهمة القليلة لن يكون هناك T-DNA متوفر لحشره في الجينات المستهدفة ويمكن في مثل هذه الحالات استخدام (**تِلِنك**) لإيجاد ما يعرف بأليلات الضربة القاضية كالقطع مثلاً، إذ تمتلك عشرة من طفرات (**تِلِنك**) نسبة احتمال قدرها 40 % لتتضمن على الأقل قطعاً واحداً، بينما تمتلك 25 طفرة احتمالية 70% [20].

هل للطفرات السابقة تأثير في نتائج (تِلِنك)؟

إن الكثافة العالية للطفرات التي تحدثها مركبات عديدة من بينها EMS التي تعد هدفاً لكثير من الباحثين، يمكن أن تتسبب في اخذ طفرات سابقة في الجينات المستهدفة، إلا أن المقارنة بين الطفرات التي تحدثها EMS وتلك الموجودة في سلالات (**تِلِنك**) تبقى أداة فعّالة في دراسة وراثة

الصفات في النباتات، وبذا تعد الطفرات السابقة مشكلة جدية . إن الطفرات في الجينات التي يمكن إن يكون لها تأثير في الصفات المظهرية التي تخضع عادة لسيطرة عدد كبير من الجينات مثل حاصل النبات أو مساحته الورقية، ربما تخضع لتداخلات التفوق و قد يكون من الضروري إجراء تضريب بينها وبين الأنواع البرية. كذلك فان الطفرات في الجينات التي يتوقع أن يكون لها تأثير على الصفات المحكومة بعدد قليل من الجينات لا يتوقع أن تنتج أشكالاً مظهرية جديدة بسبب الطفرات السابقة . كما انه ليست هناك حاجة لإجراء تضريب مع الأنواع البرية [22]. إن معاملة البذور بمادة EMS ثم زراعتها ونمو نباتات M1 وتلقيحها ذاتياً لإنتاج بذور M2 التي تنتج بزراعتها نباتات M2، والأخيرة يتم استخلاص عينات DNA من نباتاتها، وبما أن إنتاج بذور M2 يكون بعد دورة من التلقيح الذاتي، لذا فان نسبة الطفرة الواحدة في البذور الناتجة ستكون بمعدل نبات واحد بري إلى اثنين (Heterozygous) إلى واحد (Homozygous). يصبح من السهل جداً زراعة بذور هذه النباتات وتصنيف تركيبها الوراثي بسبب مرورها بدورتين من إعادة الاتحاد والانعزال في الجينات . بسبب كون ربع البذور فقط يجب أن يكون متماثل التركيب الوراثي للمظهر الواحد ومن خلال تصنيف التركيب الوراثي للنباتات حسب مواقع الجروح المستهدفة، فان احتمال الخطأ سيكون ضئيلاً!! بمعنى آخر أن التضريبين اللذين يتم إجراؤهما بعد المعاملة بالمطفر كفيلان بفصل الطفرات المستهدفة عن السابقة، وسيكون من النادر جداً تماثل النباتات وراثياً لكل من الطفرات المستهدفة والسابقة وتحديداً في تلك النباتات المنتخبة . طبقاً لكشافات الطفرات التي تم قياسها في نباتات أذن الفأر، مع الأخذ بنظر الاعتبار معدلات إعادة الاتحاد بين الجينات وجد أن احتمال انتقاء طفرات خاطئة لجين واحد مستهدف هو بحدود 0.0005 !!!. فضلاً عن أن التضريب بين سلسلة من الاليلات سوف يجلب معاً جينومين طافرين مستقلين، لذا ومن خلال تفحص الأشكال المظهرية والبحث عن التلازم بين أزواج الاليلات المتباينة وبين الشكل المظهري المتنحي، يمكن للباحث أن يقلل كثيراً من أهم ية إمكانية ارتكاب خطأ انتقاء الطفرات السابقة في الجينات المستهدفة . يمكن أن يتم فحص العديد من الأشكال المظهرية في جيل M3 وفي بعض الحالات يكون من الضروري إجراء التضريب مع الأنواع البرية، إلا انه يمكن في أغلب الحالات إجراء مسح على التراكيب الوراثية بعد دورة و احدة وغالباً دورتين من التضريب.

إن القفزات الهائلة والسريعة في تطور تقنيات الجينوم تدفع باتجاه التخلي عن الكثير من الطرائق السائدة اليوم بعد مدة وجيزة من ظهورها، في حين لا يتوقع حصول مثل هذا مع تقنية (**تِلِنك**)، إلا إذا توفرت تقنية عامة تسهل من تحوير الجينات المستهدفة، كما أن تطور العديد من التقنيات مرهون بمدى مقدرتها على إنتاج الأفراد بمعدلات عالية من خلايا مفردة بعد الانتخاب في الأنواع المهمة . إن إيجاد مستويات عالية ومستقرة من الطفرات مع المحافظة على مستوى جيد من الخصوبة والحيوية، لازال يشكل عائقاً أمام الحصول على المجتمع المناسب من الأفراد الطافرة . لذا فمن غير المتوقع أن تتوقف المحاولات الحثيثة لإيجاد سلسلة أليلية من الطفرات في المستقبل القريب، وستكون هناك حاجة ماسة إلى المزيد من المعلومات حول تتابع الجينوم في الأنواع والأجناس المختلفة . تبعاً لذلك فمن المتوقع أن يتسع نطاق استخدام طريقة (**تِلِنك**) خصوصاً في المجال الزراعي، حيث لازال بالإمكان الحصول على معلومات مفيدة حول الجينوم الفعّال، فضلاً عن تنامي شعبية مثل هذه الطرائق التي لا تتضمن تحويرات الهندسة الوراثية، كما أن تنامي المقدرة على تشخيص الطفرات النقطية على المستوى التجاري يعني تقليص عدد الخطوات اللاحقة ضمن هذه التقنية. لذا ولكون (**تِلِنك**) تعتمد على تقنيات تشخيص التغاير في تتابع الجينوم، فمن المتوقع أن يساهم التقدم في مجال تحديد تتابع DNA وتشخيص SNP في رفع كفاءة (**تِلِنك**)، وهذا يجعل منها تقنية واعدة في المستقبل المنظور الذي قد لا يتعدى بضع سنين!!.

المصـــادر

1. Alharbi, K.K., M.A. Aldahmesh, and E. Spanakis. 2005. Mutations scanning by melt MADGE: Validations using BRCA1 and LDLR, and demonstration of the potential to identify severe, moderate, silent, rare, and

paucimorphic mutations in the general population. Genome Res. 15: 967– 977.

2. Alonso, J.M., A.N. Stepanova, T.J. Leisse, C.J. Kim, H.M. Chen, P. Shinn, D.K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C.C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Guilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D.E. Carter, T. Marchand, E. Risseeuw, D. Brogden, A. Zeko, W.L. Crosby, C.C. Berry and J.R. Ecker. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Sci. 301: 653-657.

3. Antolin-Lovera, M. and M. Parniske. 2007. TILLING: Examples of utilization in plant breeding. Lotus Newsletter. 37(3): 103-104.

4. Basu, S.K., S.N. Acharya and J.E. Thomas.2008. Genetic improvement of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through EMS induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions. Euphytica, 160: 249-258.

5. Bentley, A., B. MacLennan, J. Calvo, and C.R. Dearolf. 2000. Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. Genetics, 156: 1169–1173.

6. Bingham, P.M., R. Levis and G.M. Rubin. 1981. Cloning of DNA sequence from the white locus of *Drosophila melanogaster* by a novel and general method. Cell, 25: 693-704

7. Caldwell, D.G., N. McCallum, P. Shaw, G.J. Muehlbauer, D.F. Marshall, and R. Waugh. 2004. A structured mutant population for foreward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant J. 40, 143– 150.

8. Chuang, C.F. and E.M. Meyerowitz. 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 97: 4985–4990

9. Colbert, T., B.J. Till, R. Tompa, S. Reynolds, M.N. Steine, A.T. Yeung, C.M. McCallum, L. Comai, and S. Henikoff. 2001. High-throughput screening for induced point mutations. Plant Physiol. 126, 480 – 484.

10. Comai, L., K. Young, B.J. Till, S.H. Reynolds, E.A. Greene, C.A. Codomo, L.C. Enns, J.E. Johnson, C. Burtner, A.R. Odden and S. Henikoff. 2004. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by ECOTILLING. Plant J. 37: 778 -786.

11. Comai, L. and S. Henikoff. 2006. TILLING: Practical single-nucleotide mutation discovery. The Plant Journal, 45 (4): 684–694.

12. De Francesco, L. and J.M. Perkel. 2001. In search of genomic variation. Scientist, 15: 24-26.

13. Draper, BW, C.M. McCallum, J.L. Stout, A.J. Slade and C.B. Moens. 2004. A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. Zebrafish Genetics Genomics and Informatics. 77: 91-112.

14. Ellis, N.A., S. Ciocci and J. German. 2001. Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells. Hum. Genet. 108 (2): 167–173.

15. Fagard, M. and H. Vaucheret. 2000, (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? Annual Rev. of Plant Physiol. Plant Mol. Bio. 51: 167-194

16. Freese, E. 1959. The Specific Mutagenic effect of base analogues on phage T4. J. Mol. Biol. 1: 87–105.

17. Gilchrist, E.J. and G.W. Haughn. 2005. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. Current Opinion in Plant Bio. 8: 211-215.

18. Gilchrist, E.J., G.W. Haughn, C.C. Ying, S.P. Otto, J. Zhuang, D. Cheung, B. Hamberger, F. Aboutorabi, T. Kalynyak, L. Johnson, J. Bohlmann, B.E. Ellis, C.J. Douglas, and Q.C. Cronk. 2006. Use of ECOTILLING as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. Mol. Ecology, 15: 1365-1376

19. Goldsby, R.E., L.E. Hays, X. Chen, E.A. Olmsted, W.B. Slayton, G.J. Spangrude, and B.D. Preston. 2002. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 99: 15560 – 15565.

20.Greene, E.A., C.A. Codomo, N.E. Taylor, J.G. Henikoff, B.J. Till, S.H. Reynolds, L.C. Enns, C. Burtner, J.E. Johnson, A.R. Odden, L. Comai and S. Henikoff. 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. Genetics. 164: 731-740.

21.Gross, E., N. Arnold, J. Goette, U. Schwarz-Boeger, and M. Kiechle. 1999. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. Hum. Genet. 105: 72 – 78.

22.Henikoff, S. and L. Comai. 2003. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. Annual Rev. of Plant Bio. 54: 375 – 401.

23.Henikoff, S., B.J. Till and L. Comai. 2004. TILLING: Traditional mutagenesis meets functional genomics. Plant Physiology, 135: 630-636.

24.Helliwell, C.A. and P.M. Waterhouse. 2005. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. RNA Interference. 392: 24-35.

25.Jackson, A.L., S.R. Bartz, J. Schelter, S.V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet and P.S. Linsley. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat. Biotechnol. 21: 635–637.

26.Julio, E., F. Laporte, S. Reis, C. Rothan and F.D. de Borne. 2008. Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding. Mol. Breeding, 21: 369-381.

27.Komori, T. and N. Nitta. 2005. Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers. Breeding Sci. 55: 93-98.

28.Kovalchuk, I., O. Kovalchuk and B. Hohn. 2000. Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. EMBO J. 19: 4431– 4438.

29.Krieg, D. R. 1963. Ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4rII mutants. Genetics, 48: 561–580.

30.Lander, E.S., L.M. Linton, and B. Birren. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409: 860 – 921.

31.Li, X., Y.J. Song, K. Century, S. Straight, P. Ronald, X.N. Dong, M. Lassner and Y.L. Zhang. 2001. A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. Plant J. 27: 235-242.

32.Li, X., M. Lassner and Y.L. Zhang. 2002. Deleteagene: a fast neutron deletion mutagenesis-based gene knockout system for plants. Comparative and Functional Genomics, 3: 158-160.

33.Margulies, M., M. Egholm and W.E. Altman. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 437: 376 – 380.

34.Matthew, L. 2004. RNAi for plant functional genomics. Comparative and Functional Genomics, 5: 240-244.

35.May, B.P. and R.A. Martienssen. 2003. Transposon mutagenesis in the study of plant development. Critical Rev. in Plant Sci. 22: 1-35.

36.McCallum, C.M., L. Comai, E.A. Greene and S. Henikoff. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiol. 123: 439-442.

37.McCallum, C.M., L. Comai, E.A. Greene, and S. Henikoff. 2000. Targeted screening for induced mutations. Nat. Biotechnol. 18: 455– 457.

38.Menda, N., Y. Semel, D. Peled, Y. Eshed, and D. Zamir. 2004. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. Plant J. 38: 861– 872.

39.Middendorf, L.R., J.C. Bruce, R.C. Bruce, R.D. Eckles, D.L. Grone, S.C. Roemer, G.D. Sloniker, D.L. Steffens, S.L. Sutter and J.A. Brumbaugh. 1992. Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus. Electrophoresis, 13: 487– 494.

40.Mizoi, J., M. Nakamura and I. Nishidab. 2006. Defects in CTP: phosphoryl ethanol amine transferease affect embryonic and postembryonic development in Arabidopsis. The Plant Cell, 18: 3370–3385.

41.Muller, H.J. 1930. Types of visible variations induced by x-rays in Drosophila. J. Genet. 22:299-334.

42.Muth, J., H. Stefanie, M. R. Twyman, H. Hans-Reinhard, T. Eckhard and P. Dirk. 2008. Precision breeding for novel starch variants in potato. Plant Biotechnol. J. 6(6):576-584.

43.Nagy, A, N. Perrimon, S. Sandmeyer and R. Plasterk. 2003. Tailoring the genome: the power of genetic approaches. Nat. Genet. 33: 276 –284

44.Neff, M.M., J.D. Neff, J. Chory and A.E. Pepper. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. Plant J. 14: 387-392.

45.Neff, M.M., E. Turk and M. Kalishman. 2002. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. Trends in Genetics, 18: 613-615.

46.Nickerson, D.A., N. Kolker, S.L. Taylor and M.J. Rieder. 2001. Sequence-based detection of single nucleotide polymorphisms. Methods Mol. Biol. 175: 29–35.

47.Nieto, C., F. Piron, M. Dalmais, C.F. Marco, E. Moriones, M.L. Gomez-Guillamon, V. Truniger, Gomez P., Garcia-Mas J, Aranda M.A. and A. Bendahmane. 2007. ECOTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. BMC Plant Bio. 7: 34-39.

48.Oleykowski, C.A., C.R. Mullins, A.K. Godwin and A.T. Yeung. 1998. Mutation detection using a novel plant endonuclease. Nucleic Acids Res. 26: 4597–4602.

49.Perry, J.A., T.L. Wang, T.J. Welham, S. Gardner, J.M. Pike, S. Yoshida, and M. Parniske. 2003. A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. Plant Physiol. 131: 866–871.

50.Pilon, L., Y. Langelier and A. Royal. 1986. Herpes simplex virus type 2 mutagenesis: characterization of mutants induced at the *hprt* locus of nonpermissive XC cells. Mol. Cell. Biol. 6(8): 2977–2983

51.Qiu, P., H. Shandilya, J.M. D'Alessio, K. O'Connor, J. Durocher, and G.F. Gerard. 2004. Mutation detection using Surveyor nuclease. Biotechniques, 36: 702–707.

52.Rozen, S. and H. Skaletsky. 2000. Primer-3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. 132: 365–386.

53.Shendure, J., G.J. Porreca, N.B. Reppas, X. Lin, J.P. McCutcheon, A.M. Rosenbaum, M.D. Wang, K. Zhang, R.D. Mitra, and G.M. Church. 2005. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. Sci. 309: 1728–1732.

54.Shu, Q.Y. and P.J. Lagoda. 2007. Mutation Techniques for Gene Discovery and Crop Improvement. Mol. Plant Breeding, 5: 193-195.

55.Slade, A.J., S.I. Fuerstenberg, D. Loeffler, M.N. Steine, and D. Facciotti, 2005. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. Nat. Biotechnol. 23: 75–81.

56.Smits, B.M., J. Mudde, R.H. Plasterk and E. Cuppen. 2004. Target-selected mutagenesis of the rat. Genomics, 83: 332–334.

57.Sokurenko, E.V., V. Tchesnokova, A.T. Yeung, C.A. Oleykowski, E. Trintchina, K.T. Hughes, R.A. Rashid, J.M. Brint, S.L. Moseley, and S. Lory. 2001. Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions. Nucleic Acids Res. 29: p.111.

58.Stadler, L.J. 1932. On the Genetic Nature of Induced Mutations in Plants. The Sixth International Congress of Genetics, 1: 274-294.

59.Stemple, D.L. 2004. TILLING: a high-throughput harvest for functional genomics. Nat. Rev. Genet. 5: 145–150.

60. Szarejko, I. and B. P. Forster. 2007. Doubled haploidy and induced mutation. Euphytica, 158: 359-370.

61.Tago, Y., M. Imai, M. Ihara, H. Atofuji, Y. Nagata, and K. Yamamoto. 2005. *Escherichia coli* mutator (Delta) polA is defective in base mismatch correction: the nature of in vivo DNA replication errors. J. Mol. Biol. 351: 299–308.

62.Taylor, N.E. and E.A. Greene. 2003. PARSESNP: a tool for the analysis of nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids

Res. 31, 3808– 3811.Till, B.J., Z. Troy, B. Elisabeth, A.G. Elizabeth, L. Comai and S. Henikoff. 2006. High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by ECOTILLING. Nucleic. Aci. Ds. Res. 34(13):145-152.

63.Till, B.J., T. Colbert and R. Tompa. 2003. High-throughput TILLING for functional genomics. Methods Mol. Biol. 236: 205–220.

64.Till, B.J., S.H. Reynolds and E.A. Greene. 2003. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. Genome Res. 13: 524–530.

65.Till, B.J., C. Burtner, L. Comai and S. Henikoff. 2004. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. Nucleic Acids Res. 32: 2632–2641.

66.Till, B.J., S.H. Reynolds, and C. Weil. 2004. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. BMC Plant Biol. 4: 12– 18.

67.Till, B.J., J. Cooper, T.H. Tai, P. Colowit, E.A. Greene, S. Henikoff and L. Comai. 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BMC Plant Bio. 7: 19- 26.

68.Till, B.J., T. Zerr, E. Bowers, E.A. Greene, L. Comai and S. Henikoff. 2007. High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by ECOTILLING. Nucleic Acids Res. 34(13):99-112.

69.Underhill, P.A., L. Jin, A.A. Lin, S.Q. Mehdi, T. Jenkins, D. Vollrath, R.W. Davis, L.L. Cavalli-Sforza and P.J. Oefner. 1997. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. Genome Res. 7(10): 996–1005.

70.Venter, J.C., M.D. Adams and E.W. Myers. 2001. The sequence of the human genome. Sci. 291: 1304–1351.

71.Vos, P., R. Hogers and M. Bleeker. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407–4414.

72.Walden, R. 2002. T-DNA tagging in a genomics era. Critical Reviews in Plant Sci. 21: 143-165.

73.Watanabe, S., T. Mizoguchi, K. Aoki, Y. Kubo, H. Mori, S. Imanishi, Y. Yamazaki, D. Shibata AND H. Ezura. 2007. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. Plant Biotechnol. 24: 33–38.

74.Waterhouse, P.M., M.W. Graham and M.B. Wang. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95: 13959–13964.

75.Weckx, S., J. Del-Favero, R. Rademakers, L. Claes, M. Cruts, P. De Jonghe, C. Van Broeckhoven, and P. De Rijk. 2005. novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. Genome Res. 15: 436–442.

76.Wienholds, E., F. van Eeden, M. Kosters, J. Mudde, R.H. Plasterk and E. Cuppen. 2003. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. Genome Res.13: 2700-2707.

77.Winkler, S., A. Schwabedissen and D. Backasch, 2005. Target-selected mutant screen by TILLING in Drosophila. Genome Res. 15: 718 –723.

78.Wu, J.L., C. Wu and C. Lei. 2005. Chemical- and irradiation-induced mutants of Indica Rice IR64 for forward and reverse genetics. Plant Mol. Biol. 59: 85–97.

79.Yang, B., X. Wen, N.S. Kodali, C.A. Oleykowski, C.G. Miller, J. Kulinski, D. Besack, J.A. Yeung, D. Kowalski, and A.T. Yeung. 2000. Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. Biochemistry, 39: 3533–3541.

80.Zerr, T. and S. Henikoff. 2005. Automated band mapping in electrophoretic gel images using background information. Nucleic Acids Res. 33: 2806 –2812.