

دستنامه علمی - شماره ۳

اصلاح نباتات مولکولی

نویسندگان:

دکتر ابوالقاسم محمدی

استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

دکتر حیدر عزیزی

استادیار بخش تحقیقات چغندرقد، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

دکتر پیمان نوروزی

دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

دکتر اباذر رجبی

دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

دکتر پرویز فصاحت

استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

انتشارات:

کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی

ستاد توسعه زیست فناوری

با حمایت مالی «صندوق حمایت از سرمایه گذاری زیست فناوری»

این دستنامه علمی به شماره ۵۲۹۳۸ در تاریخ ۹۶/۱۰/۲۵

در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی به ثبت رسیده است

۱۳۹۶

سرشناسه:	محمدی، ابوالقاسم.
عنوان و پدیدآور:	اصلاح نباتات مولکولی / ابوالقاسم محمدی، حیدر عزیزی، پیمان نوروزی، اباذر رجیبی، پرویز فصاحت
ناشر:	خدمات نشر انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۱۳۹۶.
مشخصات ظاهری:	سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی؛ با مشارکت: کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی؛ ستاد توسعه زیست فناوری؛ صندوق حمایت از سرمایه گذاری زیست فناوری
شابک:	۷۷ ص. مصور، جدول، نمودار. ۹۷۸-۹۶۴-۳۲۴-۳۸۳-۸
موضوع:	گیاهان -- اصلاح نژاد.
موضوع:	ژنتیک گیاهی.
موضوع:	ژنتیک مولکولی گیاهان.
شناسه افزوده:	عزیزی، حیدر، نویسنده همکار.
شناسه افزوده:	نوروزی، پیمان، نویسنده همکار.
شناسه افزوده:	رجیبی، اباذر، نویسنده همکار.
شناسه افزوده:	فصاحت، پرویز، نویسنده همکار.
رده بندی کنگره:	۱۳۹۶: ۶ الف ۳ م / SB ۱۲۳
رده بندی دیویی:	۶۳۱/۵۲



خدمات نشر انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد
مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، سازمان مرکزی جهاد دانشگاهی
ص. پ. ۱۳۷۶ - ۹۱۷۷۵ تلفن: ۳۸۸۳۲۳۶۷ دفتر پخش: ۳۸۸۴۲۲۳۰
www.jdmpress.com info@jdmpress.com

اصلاح نباتات مولکولی

نویسندگان: دکتر ابوالقاسم محمدی، دکتر حیدر عزیزی، دکتر پیمان نوروزی،
دکتر اباذر رجیبی، دکتر پرویز فصاحت

چاپ اول ۱۳۹۶ / ۲۰۰۰ نسخه چاپ و صحافی چاپخانه دانشگاه فردوسی
شابک ۹۷۸-۹۶۴-۳۲۴-۳۸۳-۸ ISBN: 978-964-324-383-8
کلیه حقوق نشر برای ناشر محفوظ است.
قیمت: ۶۰.۰۰۰ ریال

فهرست

پیشگفتار.....	۵
مقدمه.....	۷
۱. ابزارهای اصلاح مولکولی.....	۹
۱-۱ نشانگرهای مولکولی.....	۹
۱-۱-۱ انواع نشانگرهای ژنتیکی.....	۹
۱-۱-۲ امتیازدهی الگوی نواری نشانگرها و معیارهای انتخاب نشانگر مناسب.....	۱۲
۱-۲ جمعیت‌های در حال تفرد.....	۱۳
۲. تجزیه پیوستگی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی.....	۱۹
۲-۱ مقدمه.....	۱۹
۲-۲ نقشه‌های پیوستگی.....	۱۹
۲-۲-۱ مراحل تهیه نقشه‌های پیوستگی.....	۲۱
۲-۲-۲ عوامل مؤثر بر کارایی تهیه نقشه‌های پیوستگی.....	۲۴
۲-۳ مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی.....	۲۵
۲-۳-۱ روش‌های مکان‌یابی QTLها.....	۲۶
۲-۳-۲ اثرهای اپیستازی و پلیوتروپیک QTLها و اثرمتقابل آنها با محیط.....	۳۰
۲-۳-۳ عومل مؤثر در مکان‌یابی QTLها.....	۳۱
۲-۳-۴ اعتبارسنجی QTLهای مکان‌یابی‌شده و استفاده از آنها.....	۳۳
۳. مکان‌یابی ارتباطی.....	۳۵
۳-۱ عدم تعادل پیوستگی.....	۳۵
۳-۲ مکان‌یابی ارتباطی.....	۳۸
۳-۲-۱ مراحل انجام تجزیه / مکان‌یابی ارتباطی.....	۴۲
۴. گزینش به کمک نشانگر (MAS).....	۴۷
۴-۱ مقدمه.....	۴۷
۴-۲ مزایای گزینش به کمک نشانگر.....	۴۸
۴-۳ معایب گزینش به کمک نشانگر.....	۵۰
۴-۴ تلاقی برگشتی به کمک نشانگر.....	۵۰
۴-۵ تحلیل اقتصادی گزینش به کمک نشانگر.....	۵۳
۴-۶ گرایش‌های آینده.....	۵۷
۵. گزینش ژنومی (GS).....	۵۹
۵-۱ مقدمه.....	۵۹
۵-۲ مفهوم گزینش ژنومی.....	۶۰

۵-۳	نکاتی که قبل از انجام گزینش ژنوم باید به آن توجه کرد.....	۶۴
۵-۴	مراحل انجام گزینش ژنومی.....	۶۴
۵-۵	معایب روش گزینش ژنومی.....	۶۴
۵-۶	نتیجه گیری.....	۶۵
۶	کاربرد جهش های القایی در اصلاح نباتات.....	۶۷
۶-۱	مقدمه.....	۶۷
۶-۲	بهینزادی از طریق جهش.....	۶۸
۶-۳	خصوصیات ژنتیکی و اثرهای جهش های القایی.....	۶۹
۶-۴	جهش های القایی درجی.....	۷۱
۶-۵	TILLING.....	۷۳
۶-۵-۱	روش انجام TILLING.....	۷۴
۶-۵-۲	iTILLING.....	۷۶
۶-۵-۳	EcoTILLING.....	۷۷

پیشگفتار

بیوتکنولوژی یا زیست فناوری به فنونی اطلاق می شود که از موجودات زنده برای ساخت یا تغییر محصولات، ارتقای کیفی گیاهان یا حیوانات و تغییر صفات میکروارگانیسم ها برای بهبود رفاه بشر و کاربردهای ویژه استفاده می کند. به طور کلی، هر گونه فعالیت هوشمندانه بشر در خلق، بهبود و عرضه محصولات گوناگون با استفاده از موجودات زنده به ویژه از طریق مهندسی ژنتیک، در حوزه زیست فناوری قرار می گیرد. زیست فناوری، یکی از محورهای اساسی توسعه در بسیاری از کشورها قلمداد شده است. در زیست فناوری کشاورزی حوزه های مختلفی همچون کشت بافت گیاهان زینتی و درختان مثمر و غیر مثمر، مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان و حیوانات اصلاح شده ژنتیکی یا تراریخته برای ایجاد صفات برتر، تهیه کیت های تشخیصی گیاهی، دام، طیور و آبزیان به منظور شناسایی مولکولی بیماری های مختلف، تولید کودهای زیستی برای افزایش حاصلخیزی خاک و کاهش مصرف کودهای شیمیایی، تولید داروها و واکسن های نو ترکیب به منظور تأمین سلامت و بهداشت دام و طیور، استفاده از زیست مهارگرها برای کنترل و مدیریت آفات و بیماری های گیاهی، اصلاح مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در شناسایی ژنوتیپی گیاهان یا حیوانات برتر و موارد بسیار دیگر مطرح و به کار گرفته می شود. در سال های اخیر تلفیق پیشرفت ها در زیست فناوری، تحقیقات ژنومی و کاربرد نشانگرهای مولکولی با روش های اصلاح نباتات کلاسیک، اساس شاخه بین رشته ای به نام اصلاح نبات مولکولی یا اصلاح نبات بر مبنای ژنوم را ایجاد کرده است که به طور وسیعی در برنامه های اصلاح و تولید رقم در کشورهای پیشرفته به خصوص در شرکت های تولید بذر خصوصی استفاده می شود. در ایران، هرچند که این

روش‌ها در دانشگاه‌ها و مؤسسات تحقیقاتی در قالب پایان‌نامه‌ها و رساله‌های دانشجویی و یا طرح‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی هنوز جایگاه خود را در برنامه‌های اصلاحی و تولید رقم پیدا نکرده است. بنابراین، تدوین دستنامه حاضر می‌تواند اطلاعات پایه را در رابطه با ابزارها و تکنیک‌های مورد استفاده در روش‌های اصلاح نبات مولکولی و گزینش ژنومی در اختیار کارشناسان اصلاح نباتات قرار دهد و اصلاح‌گر را سریع‌تر و دقیق‌تر به اهداف اصلاحی خود برساند.

در پایان لازم می‌دانم از همکاری ستاد توسعه زیست‌فناوری معاونت علمی محترم ریاست جمهوری برای حمایت از این کمیته در انتشار نشریات و نیز به‌خاطر کمک‌های ایشان به وزارت جهاد کشاورزی در اجرایی کردن برنامه‌های زیست‌فناوری تشکر و قدردانی نمایم.

دکتر عبدالرضا باقری

رئیس کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی

مقدمه

پیش‌بینی شده است که جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۲ میلیارد نفر خواهد رسید که برای تأمین غذای این جمعیت روزافزون و دستیابی به امنیت غذایی، باید تولید غذا در جهان تا ۷۰ درصد افزایش یابد. این درحالی است که به‌علت تغییر شرایط آب‌وهوایی جهان، تولید محصولات کشاورزی تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند بیماری‌ها، خشکی، شوری و دمای بالا بوده و کاهش می‌یابد. بنابراین، چالش‌های افزایش جمعیت جهان، تغییر اقلیم و فشار بر منابع طبیعی، نیاز به یک راه‌حل پایدار جهت تولید غذا را روزبه‌روز ضروری‌تر ساخته است. این به‌مفهوم تولید بیشتر در واحد سطح با استفاده از نهاده‌های کاهش‌یافته به‌دلیل تغییر اقلیم و تعادل بین تولید بیشتر و اثر منفی کمتر بر محیط زیست می‌باشد. اگرچه اصلاح نبات کلاسیک، موفقیت‌های چشمگیری در تولید ارقام گیاهی جدید در راستای افزایش عملکرد، مقاومت به تنش زیستی و غیرزیستی داشته است و با استفاده از روش‌های اصلاحی کلاسیک ارقام متعددی در گونه‌های زراعی مختلف با خصوصیات بهبودیافته در مقایسه با خویشاوندان وحشی آنها و توده‌های بومی تولید گردیده است، ولی با توجه به سرعت رشد جمعیت، کاهش نهاده‌های کشاورزی و سخت‌شدن شرایط تولید، نیاز به روش‌های کارا، سریع و دقیق جهت تولید ژنوتیپ‌های گیاهی پرمحصول و سازگار با شرایط محیطی سخت آینده می‌باشد. در این راستا، در سال‌های اخیر تلفیق پیشرفت‌ها در زیست‌فناوری، تحقیقات ژنومی و کاربرد نشانگرهای مولکولی با روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک، اساس شاخه بین‌رشته‌ای به‌نام اصلاح نبات مولکولی^۱ یا اصلاح نبات بر مبنای ژنوم^۲ را ایجاد کرده است که به‌طور وسیعی در برنامه‌های اصلاح و تولید رقم در

1. Molecular plant breeding 2. Genome based plant breeding

کشورهای پیشرفته به خصوص در شرکت های تولید بذر خصوصی استفاده می شود. در ایران، هرچند که این روش ها در دانشگاه ها و مؤسسات تحقیقاتی در قالب پایان نامه ها و رساله های دانشجویی و یا طرح های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرد، ولی هنوز جایگاه خود را در برنامه های اصلاحی و تولید رقم پیدا نکرده است. بنابراین، تدوین دستنامه حاضر می تواند اطلاعات پایه را در رابطه با ابزارها و تکنیک های مورد استفاده در روش های اصلاح نبات مولکولی و گزینش ژنومی در اختیار خوانندگان قرار دهد. فصل ۱ دستنامه، مقدمه ای بر نشانگرهای ژنتیکی و جمعیت های در حال تفرق مورد استفاده در برنامه های مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات کمی است. در فصل ۲، تجزیه پیوستگی و مکان یابی مکان های ژنی کنترل کننده صفات کمی و در فصل ۳، عدم تعادل پیوستگی و مکان یابی ارتباطی بحث می شود. فصل های ۴ و ۵، به ترتیب گزینش به کمک نشانگر و گزینش ژنومی را مورد بحث قرار می دهند. فصل ۶، مواردی از کاربرد جهش های القایی در برنامه های اصلاح گیاهان و شناسایی ژن ها را پوشش می دهد.

۱. ابزارهای اصلاح مولکولی

۱-۱ نشانگرهای مولکولی^۱

اولین بار، ساکس^۲ در سال ۱۹۲۳ ایده استفاده از یک ویژگی مندلی (رنگ بذر) را به عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای بررسی تغییرات یک صفت کمی (وزن دانه) مطرح کرد. ولی این ایده به علت عدم وجود نشانگرهای ژنتیکی مناسب و کافی، کاربرد عملی در مطالعات صفات کمی تا ابداع نشانگرهای مولکولی به خصوص نشانگرهای DNA پیدا نکرد. نشانگرهای ژنتیکی، نواحی ژنومی رمزکننده و غیررمزکننده خاصی هستند که خود و یا صفات رمز شده توسط آنها به عنوان علائم مشخصه^۳ برای تجزیه ژنوم استفاده می شوند. بنابراین، هر خصوصیتی از یک موجود که به آسانی قابل ارزیابی بوده و توارث پذیری بالا داشته باشد می تواند به عنوان یک نشانگر استفاده شود. حداقل خصوصیات لازم برای یک نشانگر این است که: (۱) بتواند افراد را از یکدیگر متمایز کند یا به اصطلاح چندشکل^۴ باشد؛ و (۲) بدون تغییر و یا با حداقل تغییرات از نسلی به نسل دیگر منتقل شود. به عبارت دیگر، توارث پذیری بالا داشته باشد تا به طور کارا در شناسایی افراد و گزینش استفاده شود. لازم به ذکر است که توارث پذیری نشانگر به اساس ژنتیکی و تکرار پذیری آن به ماهیت تکنیکی مورد استفاده در اندازه گیری یا شناسایی نشانگر بستگی دارد.

۱-۱-۱ انواع نشانگرهای ژنتیکی

نشانگرهای ژنتیکی را می توان به دو گروه نشانگرهای مورفولوژیکی (فنوتیپی) و نشانگرهای مولکولی تقسیم کرد. نشانگرهای ژنتیکی براساس نحوه بروز آنها نیز به نشانگرهای

1. Molecular markers
2. Sax

3. Landmarkers
4. Polymorphic

بیان‌شونده^۱ شامل نشانگرهای فنوتیپی و نشانگرهای پروتئینی و نشانگرهای غیربیان‌شونده شامل نشانگرهای DNA تقسیم می‌گردند. لازم به ذکر است برخی از نشانگرهای DNA نیز جزو نشانگرهای بیان‌شونده محسوب می‌شوند. صفاتی از یک موجود زنده که دارای کنترل ژنتیکی ساده به خصوص تک‌ژنی هستند می‌توانند به عنوان نشانگرهای مورفولوژیکی استفاده شوند. این نشانگرها بیانگر وجود تغییرات قابل توارث در مورفولوژی موجودات زنده هستند و به عنوان قدیمی‌ترین روش بررسی تفاوت‌های ظاهری در گیاهان، جانوران و انسان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. صفاتی مانند وجود و عدم وجود ریشک، رنگ گل و میوه در گیاهان و رنگ پوست و چشم در انسان، مثالی‌هایی از نشانگرهای مورفولوژیکی مورد استفاده در مطالعات مختلف می‌باشند.

نشانگرهای پروتئینی، تفاوت در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های رمز شده توسط مکان‌های ژنی منفرد و یا چندگانه را نشان می‌دهند. مهمترین نشانگرهای پروتئینی مورد استفاده ایزوزیم‌ها^۲ و پروتئین‌های ذخیره‌ای^۳ می‌باشند. ایزوزیم‌ها، شکل‌های مولکولی چندگانه یک آنزیم هستند که فعالیت کاتالیزی و خصوصیات آنزیمی مشابهی دارند. ایزوزیم‌های رمز شده توسط آلل‌های چندگانه یک مکان ژنی، آلوزیم^۴ نامیده می‌شود. علاوه بر این، ایزوزیم‌ها ممکن است توسط آلل یا آلل‌های مکان‌های ژنی چندگانه رمز گردند یا ناشی از تغییرات بعد از ترجمه مانند حذف گروه‌های آمین، استیله شدن، اکسیده شدن گروه‌های سولفیل دریل^۵، حذف یا اضافه شدن کربوهیدرات‌ها یا فسفات‌ها و... باشند که این نوع، ایزوزیم‌های ثانویه^۶ نامیده می‌شوند. علاوه بر ایزوزیم‌ها، پروتئین‌های ذخیره‌ای مانند گلوترین‌ها، گلیادین‌ها، زئین‌ها، هوردئین‌ها نیز به عنوان نشانگرهای پروتئینی استفاده می‌شوند.

هر خصوصیتی از مولکول DNA که منحصر به فرد بوده و به آسانی در آزمایشگاه قابل ارزیابی باشد می‌تواند به عنوان یک نشانگر DNA استفاده شود. این نشانگرها ممکن است در قسمت‌های رمزکننده و یا غیر رمزکننده ژنوم باشند، یا به عبارت دیگر، نشانگرهای DNA

-
1. Expressed markers
 2. Isozymes
 3. Storage proteins
 4. Allozymes
 5. Sulfhydryl
 6. Secondary isozymes

ممکن است بخشی از ژن بوده و یا پیوسته با یک ژن باشند. این نشانگرها تفاوت افراد در سطح مولکول DNA را نشان می‌دهند. نشانگرهای DNA براساس روش مورد استفاده در تشخیص چندشکلی به سه گروه (الف) نشانگرهای مبتنی بر دورگ‌سازی^۱ نوکلئیک‌اسیدها، (ب) نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)^۲ و (ج) نشانگرهای مبتنی بر توالی‌یابی تقسیم می‌شوند. اساس نشانگرهای مبتنی بر دورگ‌گیری، برش DNA الگو با آنزیم‌های برشی^۳، تفکیک قطعات برشی با الکتروفورز ژل آگارز، واسرشته‌سازی و انتقال قطعات برشی به غشاهای نیتروسلولزی و یا نایلونی و دورگ‌سازی آنها با یک کاوشگر^۴ و نهایتاً مشاهده الگوی نواری حاصل است. کاوشگرهای مورد استفاده، قطعات کوچک DNA نشانمندشده با مواد رادیواکتیو و یا رنگ‌های فلورسنس می‌باشند که در نتیجه دورگ‌شدن با قطعات برشی حامل نواحی همولوگ آنها موجب تشخیص قطعات برشی هدف در نمونه‌ها می‌شوند. کاوشگرها از کتابخانه ژنومی و یا کتابخانه cDNA تهیه می‌گردند. از مهمترین نشانگرهای این گروه می‌توان به چندشکلی (تفاوت طولی) قطعات برشی (RFLP)^۵ اشاره کرد.

در نشانگرهای مبتنی بر PCR، یک ناحیه و یا نواحی خاصی از ژنوم به‌طور آزمایشگاهی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و قطعات کوچک الیگونوکلوئید به‌نام آغازگر^۶ تکثیر می‌شوند. فرایند تکثیر آزمایشگاهی، یک واکنش آنزیمی است و توسط انواع مختلف آنزیم‌های DNA پلیمرز انجام می‌گیرد. در حال حاضر انواع مختلف نشانگرهای مبتنی بر PCR در مطالعات متعدد برای اهداف مختلف استفاده می‌شوند. امروزه انواع مختلفی از این نشانگرها در مطالعات مختلف استفاده می‌شوند که نشانگرهای ریزماهواره^۷ یا توالی‌های تکراری ساده (SSR)^۸، چندشکلی (تفاوت طولی) قطعات برشی تکثیری (AFLP)^۹ و نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزن‌ها^{۱۰} مانند IRAP^{۱۱} و REMAP^{۱۲} از مهمترین آنها می‌باشند. در حال حاضر به دلیل پیشرفت در تکنیک‌های توالی‌یابی DNA و پایین آمدن هزینه و زمان لازم برای توالی‌یابی، نشانگرهای مبتنی بر توالی‌یابی به‌سرعت جایگزین سایر نشانگرهای

1. Hybridization
2. Polymerase chain reaction
3. Restriction enzymes
4. Probe
5. Restriction fragment length polymorphism
6. Primer

7. Microsatellite
8. Simple sequence repeats
9. Amplified fragment length polymorphism
10. Retrotransposon
11. Inter-retrotransposons amplified polymorphisms
12. Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

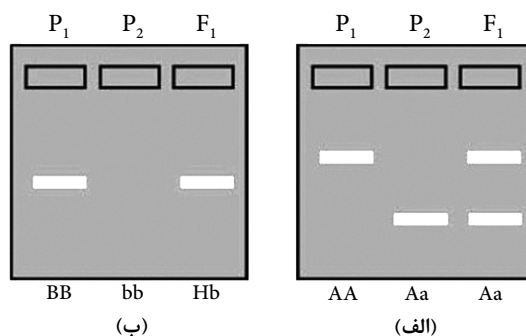
DNA می‌شوند. چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP)^۱ متداول‌ترین نشانگرهای مبتنی بر توالی‌یابی می‌باشند که ناشی از جایگزینی‌های نوکلئوتیدی (جهش‌های تک‌نقطه‌ای) هستند. این نشانگرها دارای فراوانی بالا می‌باشند. به‌طور مثال، در ژنوم انسان از هر ۳۰۰ نوکلئوتید، احتمال وجود یک SNP و در کل ژنوم بیش از ۱۰ میلیون SNP وجود دارد. اگرچه ممکن است اغلب SNPها ارتباطی با تغییرات صفات مختلف در یک موجود نداشته باشند ولی به‌دلیل تعداد زیاد آنها در مقایسه با سایر نشانگرها و پوشش ژنومی بالا، احتمال وجود SNPهای پیوسته یا مرتبط با تغییرات فنوتیپی بیشتر است. اگرچه از نظر تنوعی در هر جایگاه SNP احتمال جایگزینی چهار باز وجود دارد، ولی اغلب SNPها دوآللی بوده و حالت همباز دارند. بعد از شناسایی SNPهای مرتبط با تغییرات صفت و یا صفات مورد مطالعه، می‌توان با طراحی آغازگرهای اختصاصی برای آلل‌های جایگاه SNP، آنرا تبدیل به یک نشانگر مبتنی بر PCR کرد.

۲-۱-۱ امتیازدهی الگوی نواری نشانگرها و معیارهای انتخاب نشانگر مناسب

الگوی نواری حاصل از نشانگرهای مختلف به دو صورت غالب و همباز قابل امتیازدهی می‌باشد. اگر براساس الگوی نواری یک نشانگر بتوان افراد هموزیگوت و هتروزیگوت را از یکدیگر تفکیک کرد، اصطلاحاً گفته می‌شود الگوی نواری نشانگر به‌صورت همباز امتیازدهی شده است؛ یا به عبارت دیگر، روابط آللی بین نوارها مشخص می‌باشد. ولی اگر براساس الگوی نواری نشانگر، هتروزیگوت قابل تمایز نباشد، امتیازدهی آن نشانگر به‌شکل غالب خواهد بود (شکل ۱-۱). به‌عنوان مثال، الگوی نواری نشانگرهای SSR، SNP و RFLP (زمانی که کاوشگر از کتابخانه cDNA تهیه شده باشد) به‌صورت همباز و الگوی نواری نشانگرهایی مانند RAPD^۲، AFLP، IRAP، REMAP و RFLP (زمانی که کاوشگر از کتابخانه ژنومی باشد) به‌شکل غالب امتیازدهی می‌شود.

باتوجه به تعداد زیاد، تنوع تکنیکی و تفاوت‌هایی که از نظر میزان چندشکلی، اساس ژنتیکی و استفاده از نشانگرها وجود دارد، ممکن است این سؤال پیش آید که کدام نشانگر ژنتیکی مناسب برای دستیابی به هدف مورد نظر می‌باشد؟ پاسخ این سؤال چندان مشخص

1. Single nucleotide polymorphism
2. Random amplified polymorphic DNA



شکل ۱-۱ امتیازدهی الگوی نواری نشانگر (الف) همباز و (ب) غالب.

نیست و با توجه به موارد زیر و بررسی مورد به مورد نشانگرها و همچنین با توجه به هدف محقق، باید به انتخاب نشانگر مناسب در هر برنامه اصلاحی مبادرت کرد. با این وجود، معیارهای زیر می‌توانند در انتخاب نشانگر(های) مطلوب برای یک مطالعه خاص مدنظر قرار گیرند:

- هدف از کاربرد نشانگر
- امکان دسترسی به نشانگر
- سهولت کاربرد و عدم استفاده از مواد خطرناک مانند مواد رادیواکتیو
- امکان تبادل داده‌های حاصل و تفسیر راحت نتایج
- تکرارپذیری بالا
- هزینه لازم و زمان لازم
- میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)^۱
- تعداد نوارها یا نشانگر چندشکل در هر واکنش
- مشخص بودن جایگاه ژنومی نشانگر

۱-۲ جمعیت‌های در حال تفرق^۲

یکی از چالش‌های اصلی برنامه‌های اصلاح گیاهان، شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی (QTL)^۳ می‌باشد که از دیرباز مدنظر اصلاح‌گران بوده است. ابداع و استفاده از

1. Polymorphic information content 2. Segregating populations 3. Quantitative trait loci

نشانگرهای DNA، شناسایی و مکان‌یابی ژنومی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفات کمی و برآورد تعداد QTLها را امکان‌پذیر کرد.

لازمه مکان‌یابی QTL وجود عدم تعادل پیوستگی (LD)^۱ بین مکان‌ها در یک جمعیت ژنتیکی در حال تفرق می‌باشد. در این راستا می‌توان از جمعیت‌های در حال تفرق طبیعی و یا جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو یا چند والد استفاده کرد. در جمعیت‌های طبیعی، عدم تعادل ممکن است ناشی از جهش، جریان ژنی، گزینش و پیوستگی ژنی بوده و فاز پیوستگی، مخلوطی از فاز پیوستگی جفت^۲ و ناجفت^۳ باشد. ولی در جمعیت‌های مصنوعی عدم تعادل فقط ناشی از پیوستگی است و فاز پیوستگی در یک جمعیت فقط به یکی از حالات جفت و یا ناجفت خواهد بود.

در اغلب موارد، جمعیت‌های مصنوعی از تلاقی دو والد هموزیگوت ایجاد می‌شود. نسل F_1 حاصل از تلاقی که یک جمعیت هتروزیگوت یکنواخت و بدون تفرق ژنتیکی است برای تولید جمعیت‌های در حال تفرق مختلف مانند F_2 ، تلاقی برگشتی (BC)^۴، هاپلوئیدهای مضاعف (DH)^۵، لاین‌های اینبرد نو ترکیب (RIL)^۶ و لاین‌های تقریباً ایزوژن (NIL)^۷ مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱-۲). در گونه‌های دگرگشتی که حساس به خویش‌آمیزی (اینبریدینگ) باشند، چون تولید لاین‌های اینبرد مشکل می‌باشد و نیز در درختان که اغلب به صورت هتروزیگوت هستند، از والدین هتروزیگوت برای تولید جمعیت‌های در حال تفرق استفاده می‌شود. در چنین حالتی، نسل اول حاصل از تلاقی والدین خود، یک جمعیت در حال تفرق است و می‌تواند برای مکان‌یابی QTLها استفاده شود. به عنوان مثال، در گونه‌های دگرگشتن شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) و چاودار (*Secale montanum*)، جمعیت‌های مکان‌یابی F_1 به طور موفقیت‌آمیزی از طریق تلاقی والدین هتروزیگوت با خصوصیات متفاوت تولید و استفاده شدند.

جمعیت F_2 از خودباروری افراد F_1 ، جمعیت تلاقی برگشتی از تلاقی F_1 با یکی از والدین و جمعیت DH از کشت دانه گرده و یا بساک افراد F_1 به وجود می‌آیند. در فرایند تولید این

1. Linkage disequilibrium

2. Cis

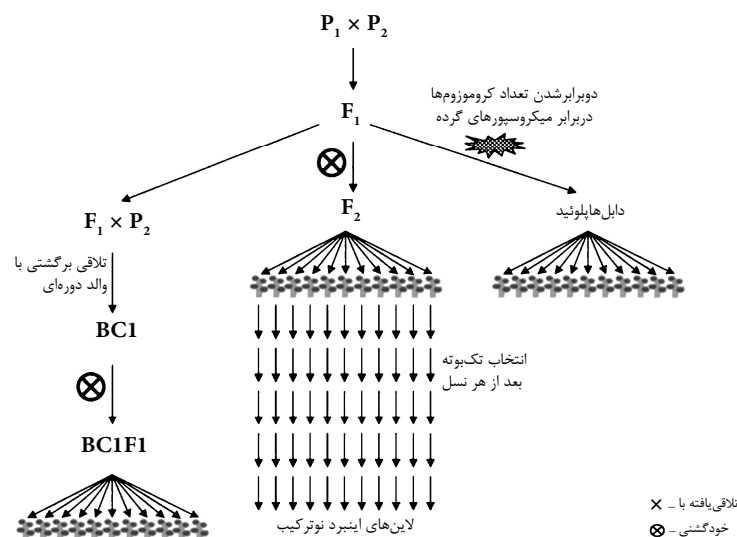
3. Trans

4. Backcross

5. Double haploid

6. Recombinant inbred lines

7. Near isogenic lines



شکل ۱-۲ جمعیت های در حال تفرق متداول مورد استفاده در تهیه نقشه پیوستگی و مکان یابی QTL ها.

جمعیت ها فقط یک چرخه میوزی رخ داده است و برای تولید آنها نیاز به یک نسل می باشد. جمعیت RIL از خود باروری مکرر افراد F_2 تا حداقل ۶ تا ۷ نسل و بدون گزینش در طی نسل های خود باروری از طریق روش «بالک تک بذری»^۱ و جمعیت NIL از تلاقی برگشتی افراد جمعیت BC با والد مربوطه به میزان ۶ تا ۷ نسل تلاقی برگشتی حاصل می گردند. لازم به ذکر است که جمعیت NIL، جمعیت متداول برای تهیه نقشه های پیوستگی^۲ و مکان یابی ژنی نیست، بلکه برای مکان یابی دقیق^۳ ژنی استفاده می شود. در افراد جمعیت RIL، سهم ژنوم دو والد یکسان می باشد و افراد از نظر میزان و نوع نوترکیبی بین ژنوم والدین تفاوت دارند ولی افراد جمعیت NIL فقط از نظر بخش کوچکی از ژنوم با یکدیگر تفاوت دارند و نوترکیبی فقط در آن بخش ژنوم وجود دارد و از نظر بقیه بخش های ژنوم خود مشابه والد تکراری می باشند.

میزان اطلاعات نوترکیبی نسبی^۴ در افراد جمعیت های F_2 و RIL برابر $2X$ است. به عبارت دیگر، افراد این دو جمعیت در هر دو کروموزوم خود نوترکیب هستند ولی در جمعیت های

1. Single seed descent

2. Linkage map

3. Fine mapping

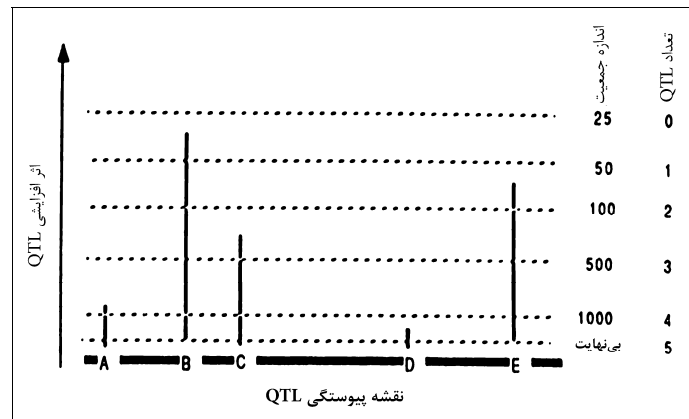
4. Relative recombination information content

BC و DH، این IX می باشد. یعنی اینکه افراد این جمعیت ها دارای یک کروموزوم والدینی و یک کروموزوم نو ترکیب هستند. بنابراین، جمعیت های F_2 و RIL با نشانگرهای همباز دارای بیشترین میزان اطلاعات نو ترکیبی نسبی را فراهم خواهند کرد. جمعیت های RIL و DH به علت هموزیگوت بودن، جمعیت های دائمی هستند و نو ترکیبی ها در آنها تثبیت شده است، بنابراین می توانند در آزمایش های تکرار دار طی مکان ها و سال ها ارزیابی شوند. در جمعیت F_2 ، کلیه ترکیبات آلل های والدینی وجود دارد. به عنوان مثال، اگر والدین جمعیت دارای ژنوتیپ های RR و rr برای یک مکان ژنی باشند، در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی آنها کلیه ژنوتیپ های ممکن یعنی RR، Rr و rr وجود خواهد داشت. ولی جمعیت BC شامل ژنوتیپ هتروزیگوت و یکی از ژنوتیپ های هموزیگوت بسته به والد تکراری و جمعیت های RIL و DH فقط حامل ژنوتیپ های هموزیگوت خواهند بود.

از عوامل مهمی که در تولید جمعیت های در حال تفرق باید مدنظر قرار گیرد، انتخاب والدین و اندازه جمعیت است. والدین جمعیت باید از دو انتهای توزیع فنوتیپی صفت مورد مطالعه انتخاب شوند تا توزیع جهت دار^۱ ژن ها و در نتیجه حداکثر تفرق در جمعیت تضمین گردد. یعنی اینکه یکی از والدین باید دارای بیشترین آلل های مطلوب و والد دیگر دارای حداکثر آلل های نامطلوب کنترل کننده صفت باشند. به عنوان مثال، اگر هدف مکان یابی QTL های مقاومت به زنگ زرد در گندم نان باشد، رقم MV17 به عنوان والد بسیار مقاوم و رقم بولانی به عنوان والد بسیار حساس گزینه های مناسب برای تولید جمعیت در حال تفرق خواهند بود. لازم به ذکر است که برای برخی صفات ممکن است تفاوت والدین معنی دار نباشد، ولی اگر در جمعیت برای صفتی تفرق مشاهده شود می توان مکان یابی ژنی را برای آن صفت انجام داد.

اندازه جمعیت نقش بسیار مهمی در کارایی تهیه نقشه های پیوستگی و مکان یابی QTL ها دارد. از نظر تئوریک، با افزایش اندازه جمعیت به دلیل افزایش تعداد نو ترکیبی در جمعیت، احتمال خطای نوع اول کاهش و قدرت آزمون و کارایی افزایش خواهد یافت. تعداد چرخه های میوزی که در فرایند تولید جمعیت رخ می دهد نیز در تعیین اندازه جمعیت مؤثر برای افزایش کارایی نقش دارد. به عنوان مثال، کارایی جمعیت RIL با ۱۵۰ فرد بسیار بالاتر از کارایی جمعیت F_2 با همان اندازه است. به طور کلی، مشخص شده است که با افزایش اندازه

1. Isodirection distribution



شکل ۱-۳ ارتباط اندازه جمعیت و تعداد QTL های شناسایی شده. پنج QTL فرضی کنترل کننده صفت با اثر افزایشی متفاوت با علائم A تا E نشان داده شده است. شکل نشان می دهد که با اندازه جمعیت کوچک، فقط QTL (های) بزرگ اثر قابل شناسایی هستند و برای شناسایی QTL های کوچک اثر نیاز به اندازه جمعیت بزرگ می باشد.

جمعیت علاوه بر اینکه احتمال خطای نوع اول کاهش خواهد یافت، بلکه احتمال شناسایی QTL های کوچک اثر که یکی از اهداف برنامه های مکان یابی ژنی است افزایش می یابد (شکل ۱-۳).

منابع منتخب

- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-196.
- Lörz, H. and Wenzel, G. 2005 *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Singh, B.D. and Singh, A.K. 2015. Mapping population. In: B.D. Singh and A.K. Singh (eds) *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices*. Springer, p.p. 125-150.

۲. تجزیه پیوستگی^۱ و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی^۲

۲-۱ مقدمه

بسیاری از صفات مهم در گیاهان مانند عملکرد، کیفیت و برخی از اشکال مقاومت به بیماری‌ها توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند که به آنها صفات کمی، چندژنی، چندعاملی یا صفات پیچیده اطلاق می‌گردد. بخش‌هایی از ژنوم یک موجود که در کنترل صفات کمی دخیل هستند تحت عنوان مکان‌های ژنی کنترل صفات کمی (QTL) نامیده می‌شوند. ناحیه ژنومی شناسایی شده به عنوان یک QTL ممکن است شامل یک ژن منفرد و یا گروهی از ژن‌ها با درجات مختلف پیوستگی ژنی باشد. مکان‌یابی QTL‌ها از دیرباز چالش اصلی برنامه‌های اصلاحی می‌باشد که با توسعه نشانگرهای DNA در دهه ۱۹۸۰، شکل عملی و کاربردی در برنامه‌های اصلاحی گیاهان مختلف پیدا کرد. یکی از روش‌های شناسایی QTL‌ها، استفاده از جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو یا چند والد، بررسی تنوع والدین با نشانگرهای مولکولی و غربال جمعیت با استفاده از نشانگرهای چندشکل است. تجزیه‌های مورد استفاده در این فرایند شامل تهیه نقشه پیوستگی جمعیت و استفاده از آن به همراه داده‌های حاصل از ارزیابی فنوتیپی جمعیت برای شناسایی QTL‌های فرضی صفت یا صفات مورد مطالعه می‌باشد.

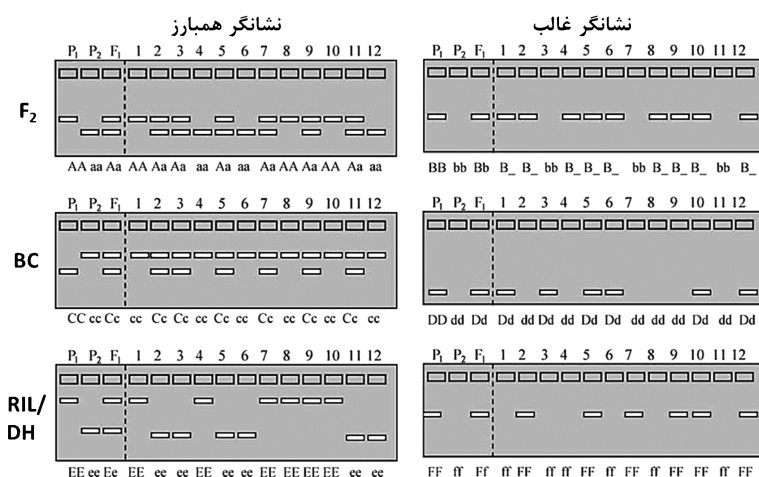
۲-۲ نقشه‌های پیوستگی

نقشه‌های پیوستگی که به نقشه‌های ژنتیکی^۳ نیز مشهور هستند، متشکل از گروه‌های پیوستگی می‌باشند. در یک نقشه پیوستگی اشباع، تعداد گروه‌های پیوستگی باید به تعداد

1. Linkage analysis 2. Quantitative trait loci mapping 3. Genetic maps

کروموزوم‌های پایه موجود بوده و هر گروه منطبق بر یک کروموزوم باشد. یک گروه پیوستگی، آرایش خطی از ژن‌ها یا نشانگرها است که در آن ترتیب و فاصله ژن‌ها یا نشانگرها از یکدیگر براساس فراوانی نوترکیبی بین آنها که از طریق کراسینگ اور طی چرخه‌های میوزی رخ می‌دهد، تعیین می‌گردد. ژن‌ها یا نشانگرهایی که از نظر فیزیکی نزدیک یکدیگر بوده یا کاملاً پیوسته باشند در مقایسه با ژن‌ها یا نشانگرهایی که دورتر از یکدیگر قرار دارند غالباً با هم از والدین به نتاج منتقل می‌شوند. بنابراین، در یک جمعیت در حال تفرق برای یک جفت مکان ژنی، مخلوطی از گامت‌های والدینی و نوترکیب وجود خواهند داشت که براساس فراوانی گامت‌ها یا ژنوتیپ‌های نوترکیب، «فراوانی نوترکیبی»^۱ محاسبه می‌گردد. این ضریب نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی بین نشانگرها است که با واحد سانتی مورگان (cM) بیان می‌شود. یک cM به مفهوم یک درصد کراسینگ اور به ازای هر میوز می‌باشد. محدوده فراوانی نوترکیبی بین ۰/۵-۰/۱۰ است و هرچه مقدار فراوانی نوترکیبی به سمت صفر میل کند نشان‌دهنده پیوستگی قوی بین دو ژن یا نشانگر و فاصله کمتر آنها از یکدیگر در روی یک کروموزوم است. فراوانی نوترکیبی برابر با ۰/۵ به معنی غیر پیوسته بودن دو مکان می‌باشد که یا با فاصله دور از یکدیگر در روی یک کروموزوم و یا در روی کروموزوم‌های مختلف قرار دارند. با توجه به اینکه فراوانی نوترکیبی بین مکان‌های ژنی خطی نیست و بین دو مکان ژنی بعد از یک فاصله معین رابطه خطی با فاصله فیزیکی ندارد و ثابت نمی‌ماند و در بیش از دو مکان نیز تابع کراسینگ اور مضاعف است، بنابراین باید به فاصله ژنتیکی خطی و افزایشی با استفاده از «توابع مکان‌یابی»^۲ تبدیل شود. توابع مکان‌یابی متعددی برای تبدیل فراوانی نوترکیبی به فاصله ژنتیکی استفاده می‌شوند که از میان آنها توابع هالدن^۳ و کوسامبی^۴ از متداول‌ترین هستند. تبدیل فراوانی نوترکیبی به فاصله ژنتیکی با تابع هالدن با فرض عدم وجود تداخل کراسینگ اور^۵ و تابع کوسامبی با فرض تداخل کراسینگ اور انجام می‌شود. منظور از تداخل کراسینگ اور این است که در صورت وقوع کراسینگ اور بین دو جایگاه، امکان وقوع کراسینگ اور بین دو جایگاه مجاور وجود ندارد.

1. Recombination frequency
 2. Mapping functions
 3. Haldane
 4. Kosambi
 5. Crossover interference



شکل ۱-۲ الگوی نواری نشانگرهای همباز (سمت چپ) و غالب (سمت راست) در جمعیت‌های F_2 ، BC ، RIL و DH . همان‌گونه که در شکل مشخص است با استفاده از نشانگرهای همباز، ژنوتیپ کلیه افراد جمعیت قابل‌شناسایی می‌باشد ولی براساس نشانگرهای غالب امکان تفکیک هموزیگوت از هتروزیگوت در جمعیت F_2 وجود ندارد.

۲-۲-۱ مراحل تهیه نقشه‌های پیوستگی

برای تهیه نقشه‌های پیوستگی، ابتدا باید چندشکلی والدین جمعیت در حال تفرق با استفاده از نشانگرهای مولکولی ارزیابی و نشانگرهای چندشکل برای غربال افراد جمعیت استفاده شوند. بعد از ارزیابی ژنوتیپی جمعیت، الگوی نواری حاصل بسته به نوع جمعیت و نشانگر مورد استفاده امتیازدهی گردد. شکل ۱-۲ نحوه امتیازدهی الگوی نواری نشانگرهای همباز و غالب را در جمعیت‌های F_2 ، BC ، RIL و DH نشان می‌دهد. با استفاده از نشانگرهای همباز، در جمعیت F_2 ، سه ژنوتیپ شامل دو ژنوتیپ هموزیگوت و یک ژنوتیپ هتروزیگوت با نسبت‌های مندلی ۱:۲:۱، در جمعیت BC ، یک ژنوتیپ هموزیگوت و یک ژنوتیپ هتروزیگوت با نسبت ۱:۱ و در جمعیت‌های RIL و DH ، دو ژنوتیپ هموزیگوت با نسبت ۱:۱ مورد انتظار است. اگر ارزیابی ژنوتیپی جمعیت با نشانگرهای غالب انجام گیرد، در هر جمعیت برای هر جایگاه دو ژنوتیپ قابل‌شناسایی خواهد بود که نسبت‌های مندلی آنها در F_2 ، ۱:۳ و در سایر جمعیت‌ها ۱:۱ خواهد بود (جدول ۱-۲).

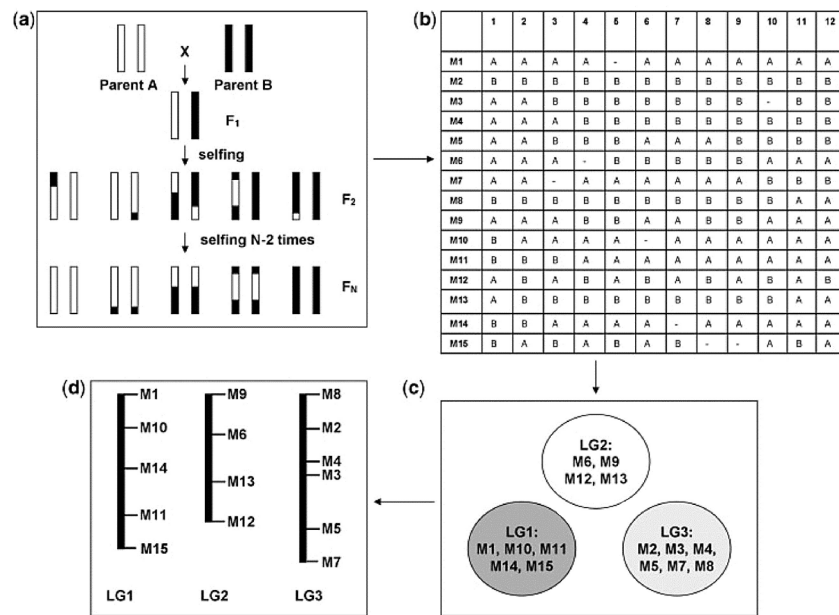
جدول ۱-۲ نسبت‌های مندلی موردانتظار برای نشانگرهای همباز و غالب در جمعیت‌های DH, BC, F₂ و RIL

جمعیت	نشانگرهای همباز	نشانگرهای بارز
F ₂	۱:۲:۱ (AA:Aa:aa)	۱:۳ (B-bb)
تلاقی برگشتی	۱:۱ (Cc:cc)	۱:۱ (Dd:dd)
لاین‌های اینبرد نوترکیب/ هاپلوپیدهای مضاعف	۱:۱ (EE:ee)	۱:۱ (FF:ff)

تجزیه‌های آماری تهیه نقشه‌های پیوستگی شامل تجزیه تک‌مکانی^۱ (آزمون انحراف از تفرق^۲)، تجزیه پیوستگی جفت‌نشانگرها، تجزیه پیوستگی چند مکان، تعیین فاصله ژنتیکی بین مکان‌ها و آرایش آنها در یک گروه پیوستگی می‌باشد. آزمون انحراف از تفرق براساس نسبت‌های مندلی موردانتظار برای جمعیت مورد استفاده در تک‌تک مکان‌های نشانگری بسته به امتیازدهی همباز یا غالب آن انجام می‌شود. عواملی مانند اریب آماری، خطای ارزیابی ژنوتیپی یا امتیازدهی و عوامل زیستی از قبیل ازدست‌رفتن کروموزوم، قابلیت باروری متفاوت گامت‌ها، وجود ژن‌های کشنده گامت، ژن‌های ناسازگاری، جفت‌شدن غیرهمولوگ کروموزوم‌ها و آرایش کروموزومی ممکن است باعث انحراف از نسبت‌های موردانتظار در برخی جایگاه‌های نشانگری باشد. اگر نشانگرهایی با انحراف از تفرق دارای توزیع تصادفی در ژنوم باشند، توصیه می‌شود در تهیه نقشه پیوستگی نهایی، این نشانگرها حذف گردند. ولی در صورتی که چنین نشانگرهایی در بخش‌های خاصی از ژنوم متمرکز شده باشند، نباید آنها را از نقشه پیوستگی حذف کرد.

بعد از آزمون انحراف از تفرق، مرحله بعدی آزمون دو مکانی برای بررسی پیوستگی احتمالی بین جفت‌نشانگرها است. در اینجا نیز آزمون براساس نسبت‌های مندلی موردانتظار برای جفت‌مکان‌ها بسته به همباز یا غالب بودن آنها انجام می‌شود و انحراف از این نسبت‌ها نشان‌دهنده پیوستگی دو مکان مورد بررسی است. اگرچه ساده‌ترین روش برای این تجزیه، آزمون کای اسکور است ولی روش حداکثر درست‌نمایی^۳، روش مورد استفاده در بیشتر برنامه‌های کامپیوتری تهیه نقشه‌های پیوستگی است. در این روش، یک تابع درست‌نمایی براساس تعداد مشاهده شده و فراوانی موردانتظار برای هر کلاس نشانگری تشکیل و تابع برای پارامترهای مجهول که در اینجا فراوانی نوترکیبی بین نشانگرهاست حل می‌گردد. در نهایت از

1. Single locus analysis 2. Segregation distortion 3. Maximum likelihood



شکل ۲-۲ مراحل ایجاد نقشه پیوستگی در یک جمعیت فرضی با ۱۲ فرد و ۱۵ نشانگر.

نسبت تابع با مقدار برآورد شده فراوانی نوترکیبی به مقدار تابع با فرض عدم وجود پیوستگی ($r = 0.5$) لگاریتم گرفته می‌شود. اگر لگاریتم بر مبنای ۱۰ باشد، این نسبت LOD^1 نامیده می‌شود. معمولاً مقادیر LOD برابر یا بزرگتر از ۳ به عنوان پیوسته بودن دو مکان است. مقدار LOD برابر ۳ نشان می‌دهد که احتمال پیوسته بودن دو نشانگر، ۱۰۰۰ بار بیشتر از احتمال عدم پیوستگی (فرض صفر) آنها می‌باشد. برای تهیه نقشه‌های پیوستگی مقدماتی می‌توان حد آستانه کمتر از ۳ را نیز برای سطح معنی داری LOD در نظر گرفت. علاوه بر LOD ، از پارامتر LR^2 نیز برای نشان دادن پیوستگی دو مکان استفاده می‌شود. رابطه بین این پارامتر عبارت از $LR = 2 \ln(L_1/L_0)$; $LOD = \log_{10}(L_1/L_0) = 0.217 LR$ است که در آنها L_0 و L_1 به ترتیب توابع درست‌نمایی با فرض پیوستگی و عدم پیوستگی بین دو مکان می‌باشد. شکل ۲-۲ مراحل ایجاد نقشه پیوستگی را در یک جمعیت فرضی نشان می‌دهد.

1. Logarithms of odd
2. Likelihood ratio

نرم‌افزارهای متعددی برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی با استفاده از جمعیت‌های درحال تفرق دووالدینی وجود دارد که ازجمله آنها می‌توان Mapmaker/EXP، MapManager QTX، MapDiao، MSTmap، DGMAP، RECORD، AntMap، MadMapper، QGene و JoinMap را نام برد که برخی از آنها به‌طور رایگان در دسترس هستند.

۲-۲-۲ عوامل مؤثر بر کارایی تهیه نقشه‌های پیوستگی

عواملی مانند نوع و اندازه جمعیت، نوع نشانگر، روش‌های آماری و حتی نرم‌افزار مورد استفاده، بر کارایی نقشه پیوستگی حاصله تأثیر دارند. به‌طوری که قبلاً ذکر گردید، جمعیت‌های F_2 ، BC، RIL و DH که جمعیت‌های متداول در تهیه نقشه‌های پیوستگی هستند، از نظر چرخه‌های میوز رخ داده در فرایند تولید آنها تفاوت دارند. اختلاف در تعداد چرخه‌های میوزی یکی از عوامل اصلی تفاوت در فاصله ژنتیکی نشانگرها در نقشه‌های ژنتیکی حاصل از این جمعیت‌ها است. به‌عنوان مثال، مقایسه نقشه پیوستگی در جمعیت‌های RIL و DH حاصل از همان تلاقی برنج نشان داده است که طول نقشه پیوستگی RIL (۱۴۶۵ سانتی‌مورگان) ۷۰/۵ درصد آن در DH (۲۰۷۹ سانتی‌مورگان) بوده است. این نشان می‌دهد میزان بالای نوترکیبی در RIL به دلیل حداقل ۶-۷ چرخه میوزی در فرایند تولید آن در مقایسه با یک چرخه میوزی در DH سبب شده است که فاصله ژنتیکی نشانگرها با دقت بیشتری برآورد گردد.

اندازه جمعیت نیز نقش مؤثری در برآورد فراوانی نوترکیبی بین نشانگرها دارد. با افزایش اندازه جمعیت، تعداد وقایع کراسینگ‌اور در جمعیت افزایش یافته و فراوانی نوترکیبی و در نتیجه فاصله ژنتیکی بین نشانگرها با دقت بیشتری برآورد خواهد شد. با استفاده از جمعیت‌های کوچک، نقشه ژنتیکی حاصل، قطعه‌قطعه بوده و آرایش نشانگرها در نقشه نیز در اغلب نواحی درست نخواهد بود. بنابراین، در جمعیت‌های F_2 و BC که در فرایند تولید آنها فقط یک چرخه میوزی رخ داده است، افزایش اندازه جمعیت تا حدودی می‌تواند دقت برآورد را افزایش دهد. در حالت کلی، نقشه‌های پیوستگی حاصل از جمعیت‌های RIL و F_2 (اندازه جمعیت در مقایسه با RIL باید بیشتر باشد) با نشانگرهای همباز دقت بالایی خواهند داشت و برعکس، نقشه پیوستگی نشانگرهای غالب در جمعیت F_2 دقت کمتری دارد. براساس مطالعات مختلف، برای تهیه یک نقشه پیوستگی قابل قبول، اندازه جمعیتی بین ۲۰۰-۱۵۰ فرد ضروری به‌نظر می‌رسد.

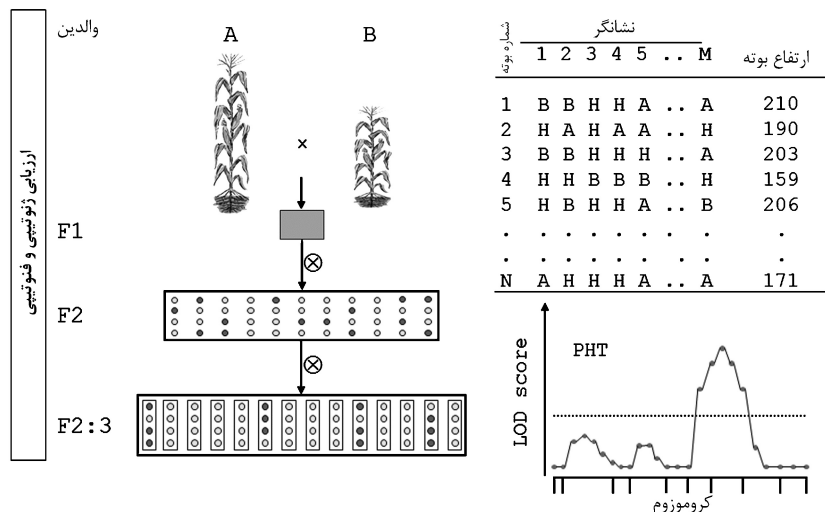
هرچند که این تعداد فرد بسته به نوع جمعیت، ماهیت ژنتیکی آنها و نوع نشانگر متفاوت خواهد بود. به‌طور کلی، انتخاب جمعیت مناسب و تعداد آن برای تهیه نقشه ژنتیکی بستگی به هدف مطالعه، موجود لازم برای تولید جمعیت، گونه گیاهی و نحوه تولید مثل آن و در نهایت نوع نشانگر قابل دسترس (همباز/غالب) دارد. به‌عنوان مثال، تولید جمعیت‌های F_2 و BC ساده بوده و زمان کمتری لازم دارد، ولی آنها از نظر ژنتیکی جمعیت‌های موقت بوده و قابل تکرار نیستند. جمعیت‌های RIL و NIL، هموزیگوت و دائمی می‌باشند و بدون تغییر ژنتیکی قابل تکثیر هستند، ولی زمان بیشتری برای تولید آنها لازم است. جمعیت DH نیز یک جمعیت دائمی است و تولید آن در مقایسه با RIL به زمان کمتری نیاز دارد ولی فقط یک چرخه میوزی در فرایند تولید آن امکان نو ترکیبی بین مکان‌ها را فراهم می‌کند.

۳-۲ مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی

اگرچه ایده بررسی و تعیین ساختار ژنتیکی صفات کمی بر اساس نشانگرهای ژنتیکی با مطالعه ارتباط بین وزن دانه (صفت کمی) و رنگ بذر (به‌عنوان نشانگر) در لوبیا در سال ۱۹۲۳ ارائه شد، ولی این ایده تا ابداع نشانگرهای DNA، شکل کاربردی پیدا نکرد. با توسعه نشانگرهای DNA در دو دهه اخیر و ابداع انواع مختلف تکنیک‌های مولکولی، امروزه مکان‌یابی QTL‌ها یکی از کارهای متداول در برنامه‌های اصلاحی گیاهان می‌باشد. تجزیه QTL مبتنی بر بررسی رابطه بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در یک جمعیت در حال تفرق است. روش‌های مورد استفاده در تجزیه QTL‌ها به دو گروه مکان‌یابی کلاسیک QTL و مکان‌یابی ارتباطی^۱ تقسیم می‌شوند، که روش اول در این فصل و روش دوم در فصل ۳ مورد بحث قرار می‌گیرد.

در روش تجزیه QTL کلاسیک، بیشتر از جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو والد که در آنها عدم تعادل ناشی از پیوستگی ژنی در حداکثر مقدار خود است برای شناسایی QTL‌ها استفاده می‌شود. بدین ترتیب که ژنوتیپ افراد جمعیت با استفاده از نشانگرهای چندشکل بین والدین تعیین و ارتباط آنها با داده‌های حاصل از ارزیابی فنوتیپی جمعیت برای شناسایی QTL‌های فرضی با استفاده روش‌های آماری مناسب مورد بررسی قرار می‌گیرد. ژنوتیپ افراد جمعیت در هر جایگاه نشانگری به‌عنوان متغیرهای موهومی برای گروه‌بندی افراد

1. Association mapping



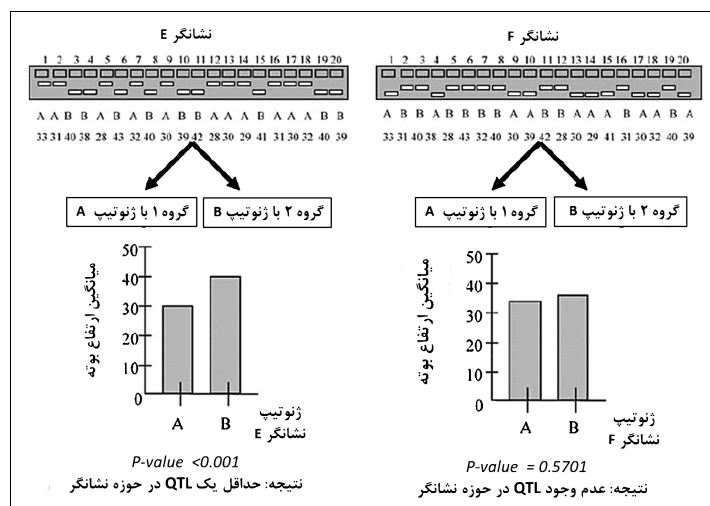
شکل ۲-۳ شمای مکان‌یابی QTL برای ارتفاع بوته در یک جمعیت F₂ فرضی با استفاده از نشانگر همبارز.

جمعیت استفاده و تفاوت گروه‌های حاصل از نظر صفت (های) مورد مطالعه بررسی می‌گردد. شکل ۲-۳ شمای مکان‌یابی QTL را نشان می‌دهد.

۲-۳-۱ روش‌های مکان‌یابی QTLها

سه روش متداول برای مکان‌یابی QTL عبارت از تجزیه تک‌نشانگری^۱، مکان‌یابی فاصله‌ای ساده (SIM)^۲ و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM)^۳ است. تجزیه تک‌نشانگری که به تجزیه تک‌نقطه‌ای نیز معروف است، ساده‌ترین روش شناسایی نشانگرهای پیوسته با QTLها می‌باشد. در این روش، افراد جمعیت براساس ژنوتیپ نشانگر به گروه‌های مجزا تقسیم و اختلاف میانگین فنوتیپی گروه‌ها با استفاده از روش‌های آماری مانند آزمون t، تجزیه واریانس (ANOVA) و رگرسیون خطی مورد بررسی قرار می‌گیرد. در آزمون t و ANOVA تفاوت معنی‌دار بین میانگین گروه‌ها و در تجزیه رگرسیون، ضریب رگرسیون معنی‌دار نشان‌دهنده وجود حداقل یک QTL در حوزه نشانگر مورد بررسی است (شکل ۲-۴). در رگرسیون خطی، ضریب تبیین (R²) برآوردی از میزان تغییرات فنوتیپی تبیین شده به وسیله نشانگر

1. Single marker analysis 2. Simple interval mapping 3. Composite interval mapping

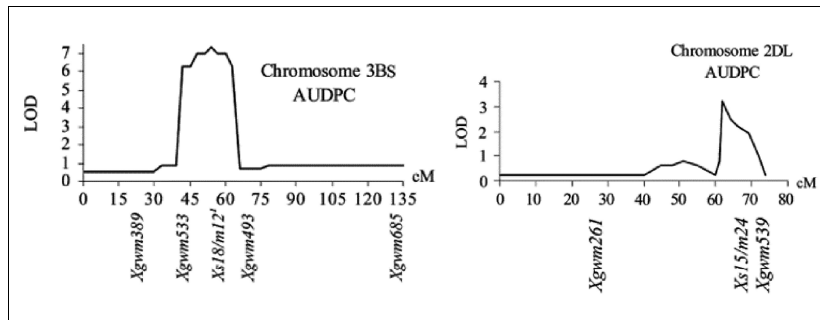


شکل ۴-۲ تجزیه تک‌نشانگری برای دو نشانگر پیوسته و غیرپیوسته به QTL(های) فرضی.

می‌باشد. در تجزیه تک‌نشانگری به‌ازای هر نشانگر یک تجزیه مستقل انجام می‌گیرد، بنابراین نیازی به نقشه پیوستگی نیست. ولی در صورت وجود نقشه پیوستگی می‌توان با انجام کروموزوم‌پیمایی^۱ اثر QTL را از فاصله آن از نشانگر تفکیک و جایگاه احتمالی QTL را تعیین کرد. این روش یک روش ساده بوده و با نرم افزارهای آماری پایه قابل انجام است. عیب عمده این روش، به‌طوری‌که ذکر شد، اختلاط اثر QTL با فاصله آن از نشانگر است. یعنی اینکه نمی‌توان بین QTL بزرگ‌اثری که در فاصله دورتر از نشانگر قرار دارد و QTL کوچک‌اثر نزدیک به نشانگر، تمایز قایل شد. علاوه‌براین، نمی‌توان اثر شناسایی‌شده مربوط به یک QTL و یا بیش از یک QTL را در حوزه نشانگر موردآزمون قرار دارد.

در مکان‌یابی فاصله‌ای ساده، واحد آزمون حدفاصل دو نشانگر مجاور است، بنابراین برای انجام این آزمون وجود نقشه پیوستگی الزامی است. در صورت وجود m نشانگر در گروه پیوستگی، m-1 تجزیه مستقل انجام خواهد شد. در این روش نیز مانند تجزیه تک‌نشانگری، فرض بر این است که در حد فاصل دو نشانگر فقط یک QTL وجود دارد. ولی در احتمال خطای نوع اول (تشخیص QTL در صورتی که واقعاً در ناحیه موردآزمون وجود نداشته باشد)

1. Chromosome walking



شکل ۵-۲: پلات LOD برای QTL های مکان یابی شده برای مقاومت به فوزاریوم سنبله گندم در کروموزوم های 3BS و 2DL.

در مقایسه با تجزیه تک نشانگری کمتر می باشد، چون در تجزیه تک نشانگری وقوع یک کراسینگ اور بین نشانگر و QTL و در SIM وقوع کراسینگ اور مضاعف بین QTL و دو نشانگر احاطه کننده آن برای خطای نوع اول لازم است. برای انجام SIM از تجزیه رگرسیون چندگانه و یا روش حداکثر درست نمایی استفاده می شود که در بیشتر برنامه های مکان یابی QTL، روش دوم متداول است و نتیجه حاصل به صورت پلات LOD نمایش داده می شود (شکل ۵-۲). در این پلات، محور افقی نقشه پیوستگی و محور عمودی مقدار LOD بین دو نشانگر مجاور را نشان می دهد. حد بحرانی معنی دار در تجزیه QTL نیز معمولاً $LOD \geq 3$ در نظر گرفته می شود. البته در برخی مطالعات بسته به وراثت پذیری و نحوه اندازه گیری آن، حد بحرانی LOD ممکن است کمتر از ۳ باشد. لازم به ذکر است که حد معنی داری LOD را می توان براساس آزمون جایگشت^۱ (به طور معمول ۱۰۰۰ جایگشت) تعیین کرد که این روش علمی تر می باشد. در پلات LOD در هر نقطه ای که میزان LOD برابر میزان بحرانی یا بیشتر از آن باشد، آن ناحیه ژنومی جایگاه احتمالی QTL خواهد بود. برای تعیین محل دقیق QTL شناسایی شده بین دو نشانگر مجاور، در اغلب برنامه های مورد استفاده امکان انجام کروموزوم پیمایی با پنجره ۵-۱ سانتی مورگان وجود دارد و در هر نقطه ای از فاصله بین دو نشانگر که حداقل میانگین مربعات خطا حاصل گردد، آن نقطه جایگاه QTL می باشد.

1. Permutation test

مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب بسط روش مکان‌یابی فاصله‌ای ساده با انتخاب تعدادی از نشانگرها علاوه بر نشانگرهای احاطه‌کننده QTL موردآزمون به‌عنوان کوفاکتور برای تفکیک تغییرات اثرهای ناشی از سایر QTL‌های پیوسته و یا ناپیوسته با QTL موردنظر است. در این روش مانند SIM ابتدا حد فاصل دو نشانگر مجاور به‌عنوان واحد آزمون برای جستجوی QTL(های) فرضی با استفاده از تجزیه رگرسیون چندگانه و یا روش حداکثر درست‌نمایی مورد بررسی قرار می‌گیرد و سپس تجزیه کواریانس با انتخاب نشانگرهای مناسب به روش رگرسیون چندگانه انجام می‌شود.

یکی از مراحل مهم در CIM، انتخاب تعداد کافی و مناسب نشانگرها به‌عنوان کوفاکتور می‌باشد. تعداد کم نشانگر به‌عنوان کوفاکتور، هدف کاهش واریانس ناشی از سایر QTL‌ها را تأمین نمی‌کند. انتخاب تعداد زیاد نشانگر به‌عنوان کوفاکتور در مدل نیز سبب کاهش قدرت آزمون خواهد شد. در نرم‌افزار QTL Cartographer، این کار در دو مرحله انجام می‌گیرد. در مرحله اول با استفاده از رگرسیون صعودی، نزولی و یا گام‌به‌گام، مجموعه‌ای از نشانگرها که رابطه معنی‌داری با تغییرات صفت نشان می‌دهند، انتخاب می‌شوند. در مرحله دوم نشانگرهای انتخابی با توجه به فاصله آنها از ناحیه موردآزمون گروه‌بندی شده و نشانگرهایی در مدل قرار می‌گیرند که سبب کاهش واریانس اشتباه گردند. از مزایای عمده این روش نسبت به SIM این است که با انجام آزمون در یک فاصله مشخص از ژنوم، جستجوی چندبُعدی برای QTL‌های چندگانه به جستجوی یک‌بُعدی تبدیل می‌شود و برآورد محل و اثر تک‌تک QTL‌ها به‌صورت دقیق و بدون اریب انجام می‌شود. همچنین با وارد کردن نشانگرهای انتخابی (کوفاکتورها) در آزمون، از اطلاعات بیشتری برای مکان‌یابی استفاده شده و سودمندی روش افزایش می‌یابد. استفاده از نشانگرهای مرتبط با QTL به‌عنوان کوفاکتور در این مدل، دقت مکان‌یابی را به‌مقدار زیادی افزایش می‌دهد.

روش مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه (MIM)^۱ برای برطرف کردن برخی از معایب CIM ارائه شده است که در آن چند فاصله نشانگری به‌طور همزمان برای شناسایی چند QTL مورد استفاده قرار می‌گیرد. درواقع، ایده اصلی MIM برای برآزش توأم اثرهای QTL‌های اختصاصی چندگانه و اثرهای اپیستازی آنها، برای تسهیل جستجو، آزمون و برآورد موقعیت،

1. Multiple interval mapping

اثرها و اثرهای متقابل QTL های چندگانه می باشد. روش MIM در مقایسه با روش های SIM و CIM بسیار قدرتمندتر و دقیق تر می باشد. مدل MIM بر پایه مدل کوکرهاام برای بررسی پارامترهای ژنتیکی و مدل حداکثر درست نمایی برای برآورد پارامترهای ژنتیکی بنا شده است. در برخی مطالعات نیز از روش بیز^۱ با تکیه بر شبیه سازی مونت کارلو^۲ برای مکان یابی QTL های چندگانه استفاده شده است.

۲-۳-۲ اثرهای اپیستازی و پلیوتروپیک QTL ها و اثر متقابل آنها با محیط

نقش اپیستازی بین مکان های ژنی در کنترل صفات کمی به خوبی شناخته شده است. اپیستازی یا اثر متقابل بین ژن ها در مکان های مختلف، نقش مهمی را در بیان صفات کمی ایفا می کند. شناسایی و برآورد اثر اپیستازی از طریق روش های کلاسیک اصلاح نباتات کار دشواری است. مدل های برآورد اپیستازی بین QTL ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی بر پایه تجزیه واریانس دوطرفه و مدل های رگرسیونی چندگانه با مؤلفه هایی برای اثر متقابل دویه دو بین نشانگرها استوار است.

در مطالعات مربوط به مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات کمی، معمولاً تعداد زیادی صفت در یک جمعیت مورد اندازه گیری قرار می گیرد و تجزیه ژنتیکی و تعیین مکان ژن های کنترل کننده این صفات روی نقشه ژنتیکی معمولاً برای هر صفت به صورت جداگانه انجام می شود. گاهی در تجزیه های تک صفتی، QTL های شناسایی شده برای صفات مختلف، جایگاه ژنومی مشابهی دارند. همبستگی های ژنتیکی بین یک جفت صفت کمی یا از QTL هایی ناشی می شود که روی هر دو صفت تأثیر می گذارد و یا ناشی از QTL هایی است که به فاصله بسیار کمی از هم روی یک کروموزوم قرار گرفته اند. در برخی موارد، تفکیک اثر پیوستگی ژنی با پلیوتروپی بسیار مشکل است. اگر همبستگی ژنتیکی بین دو صفت ناشی از پیوستگی ژنی باشد، گزینش به کمک نشانگر برای شکستن یک پیوستگی نامطلوب مفید خواهد بود. اما اگر همبستگی ناشی از اثر پلیوتروپیک باشد و تغییرات دو صفت در جهت عکس باشد، استفاده از QTL های مطلوب برای یک صفت به علت نامطلوب بودن صفت دیگر مشکل خواهد بود. تجزیه توأم همه صفات برای شناسایی اثر پلیوتروپیک و پیوستگی ژنی ضروری به نظر می رسد.

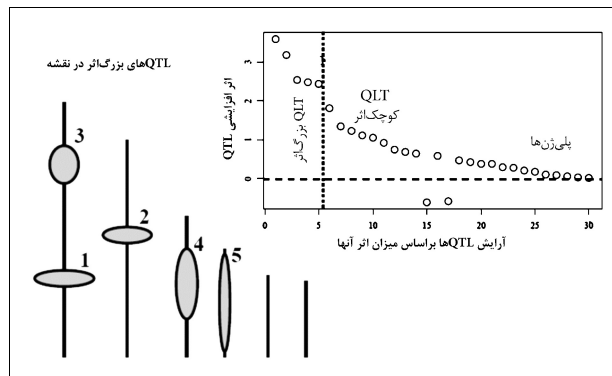
اثر متقابل ژنوتیپ $\times$ محیط (GE) از ناپایداری ارزش یک صفت در محیط‌های مختلف ناشی می‌شود. اثر متقابل ژنوتیپ در محیط یک مشکل مهم و قدیمی در اصلاح نباتات برای معرفی و تولید ارقام زراعی می‌باشد. اثر متقابل ژنوتیپ با محیط باعث کاهش همبستگی بین ژنوتیپ و محیط شده و در نتیجه انتخاب ژنوتیپ‌ها را مشکل می‌کند. موفقیت‌های اخیر در مکان‌یابی QTL‌ها باعث تمرکز تجزیه GE از سطح ژنوتیپ به سطح ژن شده است. QTL‌ها ممکن است به شرایط محیط خاصی حساس باشند و ممکن است بیان آنها در محیط‌های مختلف افزایش یا کاهش یابد. در شدیدترین نوع اثر متقابل، ممکن است در تعدادی از محیط‌ها، یک والد اثر مطلوبی در یک QTL خاص نشان دهد در حالی که در بقیه محیط‌ها همان آلل‌ها اثر نامطلوبی از خود نشان دهند. برای برآورد اثر متقابل QTL در محیط، معمولاً از جمعیت‌های RIL و DH که جمعیت‌های هموزیگوت و دائمی هستند استفاده می‌شود.

۳-۳-۲ عوامل مؤثر در مکان‌یابی QTL‌ها

عوامل متعددی در مکان‌یابی QTL‌ها مؤثر هستند که مهمترین آنها عبارت‌اند از: (۱) نوع و اندازه جمعیت مورد مطالعه، (۲) نوع نشانگر، تراکم و توزیع آنها در ژنوم، (۳) طول نقشه ژنتیکی و فاصله بین نشانگرها و QTL‌ها روی نقشه پیوستگی، (۴) اثر سایر QTL‌های در حال تفرق در ژنوم، (۵) سطح بحرانی آزمون‌های آماری، (۶) اثرهای محیطی که در صورت شناسایی و برآورد شدن باعث افزایش قدرت آزمون می‌شوند، (۷) توزیع فنوتیپی صفت در جمعیت (انحراف از توزیع نرمال قدرت آزمون را کاهش می‌دهد)، (۸) روش‌های آماری مورد استفاده در مکان‌یابی QTL‌ها، (۹) تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفت و تعداد ژن‌های در حال تفرق در والدین، و (۱۰) وراثت‌پذیری صفت.

منظور از اثر QTL، میزان تغییرات فنوتیپی تبیین‌شده توسط آن می‌باشد. براین اساس می‌توان QTL‌ها را به بزرگ‌اثر^۱، کوچک‌اثر^۲ و پلی‌ژن‌ها^۳ تقسیم کرد (شکل ۶-۲). لازم به ذکر است معیار خاصی برای مرزبندی بین انواع QTL وجود ندارد و این بستگی به نحوه کنترل

1. Major QTL
2. Minor QTL
3. Polygenes



شکل ۶-۲ آرایش QTL ها براساس میزان تبیین تغییرات فنوتیپی صفت مورد مطالعه.

ژنتیکی صفت دارد. به عنوان مثال، برای عملکرد دانه، یک QTL با تبیین فنوتیپی ۱۰٪ ممکن است یک QTL بزرگ اثر محسوب گردد ولی برای صفاتی مانند ارتفاع بوته، چنین QTLی کوچک اثر در نظر گرفته می شود. با این وجود، QTL های با اثرهای فنوتیپی ۱۵٪ و بالا برای اغلب صفات می توانند بزرگ اثر در نظر گرفته شوند. مطالعات نشان داده است که در بیشتر موارد نواحی ژنومی شناسایی شده به عنوان QTL های بزرگ، نواحی ژنومی چندین ژن با پیوستگی قوی می باشد.

تعداد مطلق برای نشانگرهای لازم جهت یک نقشه ژنتیکی وجود ندارد، زیرا تعداد نشانگر بستگی به تعداد و طول کروموزوم های موجود مورد نظر دارد. برای مکان یابی اولیه QTL ها، یک نقشه اولیه شامل ۱۰۰ تا ۲۰۰ نشانگر با توزیع یکنواخت کافی به نظر می رسد هرچند که این تعداد بستگی به اندازه ژنوم گونه مورد نظر دارد. به طوری که برای مکان یابی در گونه هایی با ژنوم بزرگتر و نیز مکان یابی دقیق QTL ها جهت استفاده در برنامه های گزینش به کمک نشانگر (MAS)، نشانگرهای بیشتر و نقشه های ژنتیکی اشباع تری مورد نیاز است. گزارش شده است که قدرت شناسایی یک QTL در فاصله ۱۰ cM از نشانگر با حالتی که تعداد نامحدودی نشانگر وجود داشت عملاً برابر بود و این توانایی برای فاصله ۲۰ یا حتی ۵۰ cM از نشانگر فقط اندکی کاهش یافت.

۴-۳-۲ اعتبارسنجی QTL‌های مکان‌یابی‌شده و استفاده از آنها

یکی از مشکلات استفاده از جمعیت‌های مصنوعی برای مکان‌یابی QTL‌ها، این است که QTL شناسایی‌شده در جمعیت ممکن است قابل استفاده در پایه‌های ژنتیکی دیگر نباشد. بنابراین، توصیه می‌شود قبل از استفاده QTL‌های شناسایی‌شده و نشانگرهای پیوسته با آنها در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر، اعتبارسنجی آنها از طریق مطالعات تأییدی (مطالعات تکراردار) در همان جمعیت و یا جمعیت‌های دیگر انجام گیرد. به عبارت دیگر، باید جایگاه و اثر QTL‌ها تأیید گردد. برای مکان‌یابی دقیق QTL‌های شناسایی‌شده و تأیید دقیق آنها، جمعیت NIL حاصل از تلاقی برگشتی با والد دارنده آلل مطلوب QTL‌های موردنظر گزینه مناسبی خواهد بود. با توجه به اینکه در بیشتر گیاهان زراعی، QTL‌های کوچک اثر قبلاً با استفاده از روش‌های کلاسیک در ژرم پلاسماهای اصلاحی تثبیت شده‌اند، بنابراین در برنامه‌های MAS، QTL‌های کوچک با اثرهای اپیستازی می‌توانند راه مؤثری برای بهبود صفت مورد مطالعه در والد گیرنده باشند.

منابع منتخب

- Cheema, J. and Dicks. 2009. Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. *Briefings in Bioinformatics*, 10: 595-608.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-196.
- Sehgal, D., Singh, R. and Rajpal, V.R. 2016. Quantitative Trait Loci Mapping in Plants: Concepts and Approaches. In: V.R. Rajpal, S.R. Rao and S.N. Raina (eds). *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement*. Vol 2. Springer, p.p. 31-59.

۳. مکان‌یابی ارتباطی^۱

۳-۱ عدم تعادل پیوستگی^۲

در یک جمعیت بزرگ با آمیزش یا تلاقی تصادفی، در صورت عدم وجود جهش، گزینش و مهاجرت، فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر تغییر نخواهد کرد که در این صورت در تعادل هاردی-واینبرگ^۳ خواهد بود. علاوه بر عوامل فوق‌الذکر، پیوستگی و یا ارتباط بین مکان‌های ژنی نیز می‌تواند باعث عدم تعادل گردد. ارتباط غیرتصادفی بین آلل‌ها یا ژن‌ها در دو یا چند مکان ژنی را صرف‌نظر از پیوسته و یا غیرپیوسته بودن آنها، عدم تعادل پیوستگی یا به عبارت صحیح‌تر عدم تعادل فاز گامتی^۴ گویند. در جمعیت‌های مصنوعی، عدم تعادل فقط ناشی از پیوستگی ژنی است ولی در جمعیت‌های طبیعی عدم تعادل می‌تواند از عواملی مانند جهش، مهاجرت، گزینش، تلاقی غیرتصادفی، اندازه جمعیت کوچک و نیز ارتباط غیرتصادفی بین آلل‌ها در مکان‌های مختلف باشد.

دو اصطلاح پیوستگی و عدم تعادل پیوستگی اغلب گمراه‌کننده است. اگرچه این دو اصطلاح ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند، با این وجود تفاوت قابل توجهی نیز بین این دو وجود دارد. منظور از پیوستگی توارث همبسته جایگاه‌های ژنی است که به علت نزدیکی فیزیکی ژن‌ها یا جایگاه‌ها در یک کروموزوم اتفاق می‌افتد، درحالی‌که عدم تعادل پیوستگی به معنی ارتباط غیرتصادفی یا همبستگی بین آلل‌ها در مکان‌های مختلف در یک جمعیت است. پیوستگی زیاد بین دو ژن (آلل) باعث ایجاد سطح بالایی از عدم تعادل پیوستگی می‌شود.

1. Association mapping

2. Linkage disequilibrium

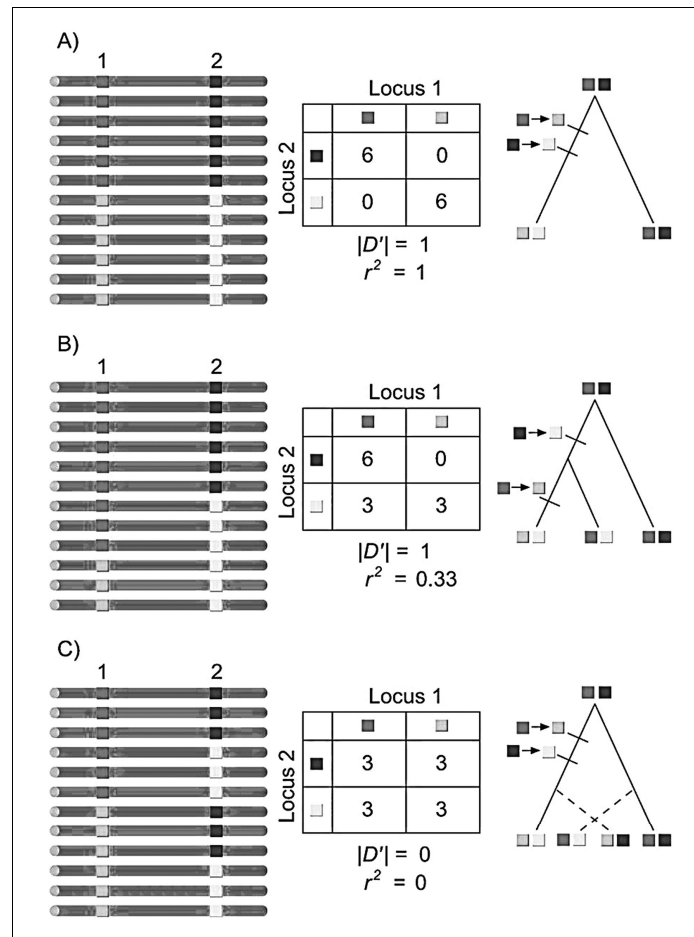
3. Hardy-Wienberg

4. Gametic phase disequilibrium

به‌عنوان مثال، اگر دوجش در نزدیکی یکدیگر اتفاق افتند، به‌دلیل آنکه در طی زمان این دو دستخوش نیروهای گزینشی و رانشی مشابهی می‌شوند و به‌دلیل احتمال نوترکیبی پایین بین آنها، سطح بالایی از همبستگی و عدم‌تعادل پیوستگی بین این دو وجود خواهد داشت. آماره‌های متعددی برای برآورد میزان عدم‌تعادل پیوستگی بین دو مکان استفاده می‌شوند که متداول‌ترین آنها، آماره‌های r^2 و D' می‌باشند. در برآورد میزان عدم‌تعادل پیوستگی با استفاده از آماره D' ، فقط وقایع نوترکیبی در نظر گرفته می‌شود، ولی در آماره r^2 ، علاوه‌بر نیروی تکاملی حاصل از نوترکیبی، وقایع حاصل از جهش نیز مدنظر قرار می‌گیرد. میزان عدم‌تعادل پیوستگی بین صفر و یک متغیر است. عدد یک نشان‌دهنده ارتباط کامل بین آلل‌ها در دو مکان و عدد صفر نشانگر عدم‌وجود ارتباط بین آنها یا به‌عبارت دیگر، استقلال دو مکان می‌باشد. شکل ۱-۳، برآورد میزان عدم‌تعادل پیوستگی را با استفاده از این دو آماره در سه حالت مختلف نشان می‌دهد.

در حالت اول (A)، ارتباط آلل در دو جایگاه SNP کامل است و برآورد میزان عدم‌تعادل با استفاده از هر دو آماره، یک می‌باشد. به‌طوری‌که در درخت‌واره سمت راست مشخص است، عدم‌تعادل پیوستگی مطلق زمانی خواهد بود که جهش همزمان در هر دو جایگاه اتفاق افتاده و بین آنها نوترکیبی رخ ندهد. در این صورت، تنها دو نوع ترکیب آللی در جمعیت وجود خواهد داشت و تأثیر جهش و نوترکیبی برای هر دو جایگاه مشابه است. بنابراین، مقدار عددی هر دو آماره برابر یک خواهد بود.

در حالت B، تغییرات در دو جایگاه به‌طور کامل با یکدیگر همبسته نیستند و شواهدی مبنی بر وجود نوترکیبی بین این دو جایگاه در دسترس نیست. چنین حالتی هنگامی رخ می‌دهد که جهش در دو جایگاه به‌طور همزمان رخ ندهد، بنابراین ممکن است در یک فرد، در یک جایگاه جهش اتفاق بیفتد، ولی در جایگاه دیگر آلل از نوع وحشی باشد. صرف‌نظر از تفاوت در وقوع جهش در دو جایگاه، نیروی نوترکیبی برای هر دو جایگاه ژنی مشابه یکدیگر عمل می‌کند. در چنین شرایط، برآورد میزان عدم‌تعادل پیوستگی با استفاده از دو آماره r^2 و D' متفاوت، از یکدیگر متفاوت است. به‌نظر می‌رسد که برآورد حاصل از D' ، برآوردی بالا می‌باشد و تفاوتی با عدم‌تعادل کامل ندارد.



شکل ۳-۱ عدم تعادل پیوستگی در حالت‌های مختلف ارتباط بین دو جایگاه و مقایسه برآوردهای دو آماره r^2 و D' .

برای حالت C، دو مکان در حالت تعادل پیوستگی قرار دارند. این زمانی اتفاق می‌افتد که دو جایگاه یا از نظر فیزیکی پیوسته نیستند و یا در صورت پیوستگی، کراسینگ‌اور کامل بین آنها رخ می‌دهد. در چنین شرایطی، برآورد میزان عدم تعادل پیوستگی بین دو جایگاه با استفاده از هر دو آماره صفر خواهد بود.

به‌طوری‌که در شکل ۱-۳ نشان داده شده است، جهش، به‌صورت همزمان آلل‌ها را در دو جایگاه تغییر می‌دهد و دو ترکیب آللی مشابه حالت A ایجاد می‌شود، اما نوترکیبی بعد از وقوع جهش، باعث ایجاد دو ترکیب آللی دیگر شده و در نتیجه هر چهار ترکیب آللی ممکن در جمعیت پدیدار می‌گردد.

در صورت کوچک‌بودن اندازه نمونه و یا فراوانی پایین آلل‌ها، قدرت برآورد هر دو آماره کاهش می‌یابد. با این وجود، آماره D' نسبت به r^2 بیشتر تحت تأثیر این عوامل قرار می‌گیرد، زیرا احتمال یافتن همه چهار ترکیب آللی در این شرایط کاهش می‌یابد (حتی در صورت ناپیوسته‌بودن جایگاه‌های ژنی). به دلایل ذکرشده فوق در مطالعات مکان‌یابی ارتباطی، آماره r^2 نسبت به D' ترجیح داده می‌شود.

عدم تعادل پیوستگی، کاربرد مهمی در مطالعات مکان‌یابی ارتباطی دارد. در صورت وجود عدم تعادل پیوستگی بین نشانگر مولکولی و ژن‌های کنترل‌کننده یک صفت خاص می‌توان ارتباط معنی‌دار نشانگر-صفت را تعیین کرد و از آن در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. بنابراین، در مکان‌یابی ارتباطی تعیین میزان عدم تعادل پیوستگی بین نشانگر و صفت از اهمیت خاصی برخوردار است.

امروزه مطالعه عدم تعادل پیوستگی در بسیاری از گیاهان چه در سطح ژن و چه در سطح کل ژنوم صورت گرفته است (جدول ۱-۳). این مطالعات شامل موارد زیر است:

- تخمین میزان عدم تعادل پیوستگی در ژنوم گونه‌های متفاوت و یا قسمت‌های مختلف ژنوم یک گونه،
- میزان تنوع نوکلئوتید (ساختار هابلوتیپ)،
- ارزیابی تأثیر گزینش (اهلی شدن) بر عدم تعادل پیوستگی،
- شناسایی ارتباط نشانگر-صفت.

۳-۲ مکان‌یابی ارتباطی

هرچندکه اطلاعات کمی در رابطه با ساختار ژنتیکی صفات مهم و به‌ویژه صفات کمی وجود دارد، با این وجود، در حال حاضر روش‌های مختلف ژنومیک، امکان تعیین دقیق اساس

جدول ۱-۳ عدم تعادل پیوستگی در گونه‌های مختلف گیاهی

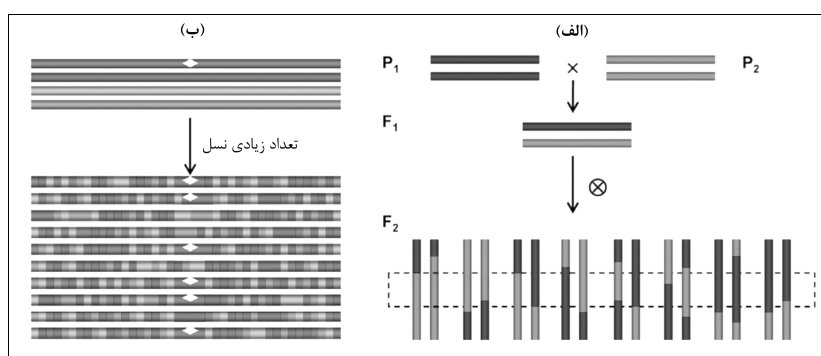
گیاه	سیستم تولیدمثلی	دامنه عدم تعادل پیوستگی
ذرت	دگرگشن	۰.۵-۷ کیلوباز (kb)
جو	خودگشن	۱۰-۲۰ سانتی‌مورگان
گندم تتراپلوئید	خودگشن	۱۰-۲۰ سانتی‌مورگان
برنج	خودگشن	۱۰۰ کیلوباز (kb)
سورگوم	خودگشن	۴ < سانتی‌مورگان یا ۱۰ ≤ کیلوباز (kb)
نیشکر	دگرگشن / تکثیر غیرجنسی	۱۰ سانتی‌مورگان
آرابیدوپسیس	خودگشن	۲۵۰ کیلوباز (kb)
سویا	خودگشن	۵۰ > کیلوباز (kb)
چغندر قند	دگرگشن	۳ < سانتی‌مورگان
سیب‌زمینی	خودگشن	۱-۰.۳ سانتی‌مورگان
کاهو	خودگشن	۲۰۰ ~ کیلوباز (kb)
انگور	تکثیر غیرجنسی	۵۰۰ جفت‌باز (bp)
کاج نروژی	دگرگشن	۲۰۰-۱۰۰ ~ جفت‌باز (bp)
کاج استخری	دگرگشن	۱۵۰-۱۰۰ جفت‌باز (bp)
کاج استخری	دگرگشن	۱۵۰۰ ~ جفت‌باز (bp)

ژنتیکی صفات کمی را فراهم کرده است. دو روش ژنتیک اصلی برای مطالعه ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ، روش کلاسیک مکان‌یابی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی (QTL mapping) و مکان‌یابی ارتباطی می‌باشند.

روش مکان‌یابی QTL براساس استفاده از جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو یا چند والد و بررسی تفرق همزمان آلل‌های نشانگر با مشاهدات فنوتیپی می‌باشد. در یک جمعیت در حال تفرق دووالدی، به علت فرصت کم برای نوترکیبی، عدم تعادل پیوستگی بین مکان‌ها بالا می‌باشد و حتی ممکن است نشانگرهای با فاصله بیشتر با ژن‌های کنترل‌کننده صفت موردنظر با تغییرات فنوتیپی صفت تفرق همزمان نشان دهند. اگرچه این روش به طور موفقیت‌آمیز در شناسایی QTL‌ها برای صفات متعددی و در بسیاری از گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، ولی با توجه به اینکه ناحیه شناسایی شده به عنوان یک QTL، ممکن است از نظر فیزیکی بسیار بزرگ بوده و شامل چندین ژن باشد، بنابراین شناسایی QTL‌های

کاندیدای مناسب را با مشکل مواجه می سازد. از طرفی، تولید جمعیت های مصنوعی مناسب برای مکان یابی QTL ها مانند لاین های خویش آمیخته نوترکیب (RILs) که از طریق تلاقی های کنترل شده و چندین نسل خودباروری ایجاد می شوند، زمانبر بوده و این نیز خود یکی دیگر از محدودیت های استفاده از این روش می باشد.

مکان یابی ارتباطی یک روش مکمل و کارا جهت شناسایی ارتباطات بین تنوع نشانگری و تغییرات یک صفت در جهت شناسایی جایگاه ژنومی ژن های کنترل آن می باشد که به طور گسترده ای در ژنتیک انسانی و جانوری که در آنها ایجاد جمعیت های در حال تفرق بزرگ غیر ممکن می باشد، استفاده می شود و در حال حاضر کاربرد آن در ژنتیک گیاهی نیز گسترش یافته است. این روش دارای مزایایی نسبت به روش کلاسیک مکان یابی QTL از جمله افزایش وضوح جایگاه QTL، استفاده از ژرم پلاسِم طبیعی و افزایش پوشش آللی می باشد. با توجه به اینکه جمعیت های طبیعی مورد استفاده در مکان یابی ارتباطی طی سالیان متعدد از جد یا اجداد مشترک منشأ گرفته اند و به علت وقوع نوترکیبی زیاد در طی تکامل آنها، پیوستگی های ضعیف بین ژن ها شکسته شده و ارتباط ژن ها در بلوک های عدم تعادل پیوستگی درون ژنوم بسیار قوی می باشد، بنابراین، در این روش مکان یابی از کلیه نوترکیبی های انجام شده در چرخه های میوزی رخ داده در طول تاریخچه تکاملی گیاه استفاده می شود. ولی در روش کلاسیک مکان یابی فقط نوترکیبی های محدود طی حداکثر ۶-۷ نسل اتفاق می افتد (شکل ۲-۳). بنابراین، عدم تعادل پیوستگی در این جمعیت ها بسیار سریع تر از جمعیت های مصنوعی از بین می رود. همچنین ساختار یک جمعیت که منجر به افزایش عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرهای غیر پیوسته می شود و در مطالعات ژنتیکی، برای توضیح روابط بین افراد درون و بین جمعیت ها استفاده می شود و چشم اندازی را در رابطه با روابط تکاملی افراد در یک جمعیت باز می کند، در جمعیت های مصنوعی مکان یابی در نظر گرفته نشده و به افزایش احتمال اشتباه نوع اول که خود باعث اریبی برآوردهای اثرات آللی می شود، منجر می شود. به علاوه نادیده گرفتن ساختار جمعیت در این جمعیت ها، به علت همبستگی کمتر بین نشانگرها و ژن ها که ناشی از کاهش عدم تعادل پیوستگی است، باعث کاهش قدرت آماری (افزایش احتمال اشتباه نوع دوم) می شود. بنابراین در نظر گرفتن ساختار جمعیت در مطالعات



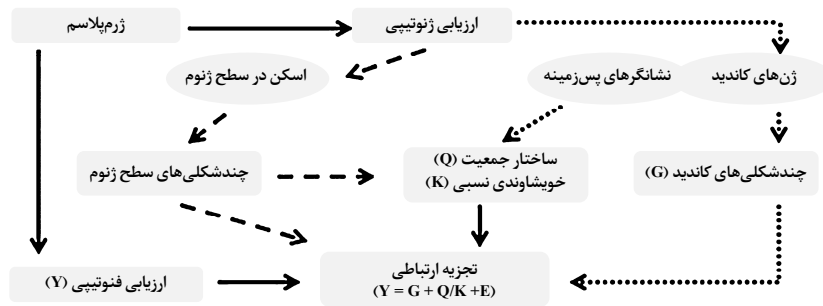
شکل ۲-۳ مقایسه مکان‌یابی با جمعیت دوالدی (الف)، مکان‌یابی ارتباطی با جمعیت طبیعی (ب).

مکان‌یابی ارتباطی به منظور شناسایی واریانت‌های کمیاب در مکان‌هایی که بین جمعیت‌ها متغیر هستند، ولی به طور شایعی درون زیرجمعیت‌ها تثبیت شده‌اند، مهم می‌باشد.

اصطلاح مکان‌یابی ارتباطی و عدم تعادل پیوستگی در برخی موارد به صورت معادل مورد استفاده قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که در مکان‌یابی ارتباطی، هدف تعیین ارتباط بین یک نشانگر و ژن‌های کنترل‌کننده یک صفت کمی است، ولی عدم تعادل پیوستگی به ارتباط غیرتصادفی آلل‌ها یا ژن‌ها در دو یا چند مکان ژنی اطلاق می‌شود. موفقیت مکان‌یابی ارتباطی بستگی به میزان وجود عدم تعادل بین نشانگرها و آلل‌های کنترل‌کننده صفت کمی دارد.

مکان‌یابی ارتباطی ممکن است به صورت مکان‌یابی در سراسر ژنوم^۱ باشد، که در آن از چندشکلی موجود در سراسر ژنوم در افراد جمعیت برای تعیین نواحی ژنومی مرتبط با تغییرات فنوتیپی یک صفت کمی برای شناسایی QTL‌های مربوطه استفاده می‌شود. در این روش، ابتدا کل ژنوم افراد جمعیت با استفاده از روش‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS)^۲ برای شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) توالی‌یابی و سپس ارتباط SNP‌ها در سراسر ژنوم با داده‌های فنوتیپی افراد برای تعیین SNP‌های مرتبط با تغییرات صفت بررسی می‌گردد. روش دوم، مکان‌یابی ارتباطی ژن‌های کاندیدا^۳ است که در آن هدف تعیین رابطه چندشکلی موجود در داخل ژن(های) کاندیدا (ژن‌هایی که فرض می‌شود در تعیین تنوع فنوتیپی صفتی

1. Genome-wide association mapping
2. Next generation sequencing
3. Candidate-gene association mapping



شکل ۳-۳ روش‌های مکان‌یابی ارتباطی ژن‌های کاندیدا (در این روش ژن‌های کاندیدا براساس اطلاعات حاصل از جهش ژن، تجزیه مسیر بیوشیمیایی و یا مکان‌یابی پیوستگی انتخاب می‌شوند و نشانگرهای تصادفی برای بررسی رابطه ژنتیکی ژن با صفت موردنظر به کار می‌روند) و مکان‌یابی ارتباطی کل ژنوم (روشی جامع برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژنوم است. به‌طوری‌که تعداد زیادی نشانگر برای تعیین ارتباط نشانگر-صفت مورد استفاده قرار می‌گیرد و نیازی به اطلاعات اولیه درباره ژن‌های کاندیدا ندارد).

خاص نقش دارند) با تغییرات فنوتیپی صفت مدنظر می‌باشد (شکل ۳-۳). بدین ترتیب که ابتدا SNP‌های درون ژن با استفاده از توالی کامل یا بخشی از آن شناسایی و سپس ارتباط هر کدام از SNP‌ها با تغییرات فنوتیپی صفت براساس مدل‌های آماری خاص تعیین می‌گردد (شکل ۳-۳).

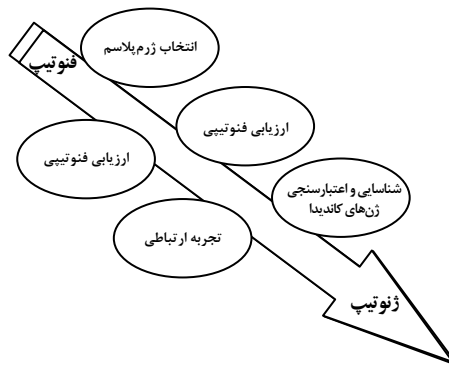
روش مکان‌یابی ارتباطی برای اولین بار در ژنتیک انسانی و برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مندلی مانند ناهنجاری‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت، اما در سال‌های اخیر به‌علت مزایای زیاد آن در مقایسه با روش کلاسیک مکان‌یابی QTL‌ها، کاربرد آن در مطالعات مکان‌یابی ژنی گیاهان نیز رو به افزایش است (جدول ۲-۳).

۱-۲-۳ مراحل انجام تجزیه/مکان‌یابی ارتباطی

- گزینش ژرم پلاسما،
- تجزیه ژنتیکی ژرم پلاسما،
- تجزیه فنوتیپی ژرم پلاسما،
- تجزیه ارتباطی و شناسایی ژن‌های کاندیدا و اعتبارسنجی آنها (شکل ۴-۳).

جدول ۲-۳ برخی مطالعات مکان‌یابی ارتباطی در گیاهان مختلف

گونه گیاهی	جمعیت	اندازه نمونه	تعداد نشانگر	صفات
ذرت	لاین‌های اینبرد متنوع	۹۲	۱۴۱	زمان گلدهی
	لاین‌های اینبرد الیت	۷۱	۵۵	زمان گلدهی
	لاین‌های اینبرد متنوع و توده‌های بومی	۳۷۵+۲۷۵	۵۵	زمان گلدهی
	لاین‌های اینبرد متنوع	۹۵	۱۹۲	زمان گلدهی
	لاین‌های اینبرد متنوع	۱۰۲	۴۷	ترکیبات دانه و خصوصیات خمیری نشاسته
	لاین‌های اینبرد متنوع	۸۶	۱۴۱	ساخت Maysin
	لاین‌های اینبرد الیت	۷۵		رنگ دانه
	لاین‌های اینبرد متنوع	۵۷		طعم مطبوع
	لاین‌های اینبرد الیت	۵۵۳	۸۹۵۰	میزان اولنیک‌اسید
	لاین‌های اینبرد متنوع	۲۸۲	۵۵۳	میزان کارتنوئید
آرابیدوپسیس	اکوتیپ‌های متنوع	۹۵	۱۰۴	زمان گلدهی
	اکوتیپ‌های متنوع	۹۵	۲۵۵۳	مقاومت به بیماری و زمان گلدهی
	اکوتیپ‌های متنوع	۹۶		انشعابات اندام‌های هوایی
سورگوم	لاین‌های اینبرد متنوع	۳۷۷	۴۷	Community resource report
گندم	ارقام متنوع	۹۵	۹۵	اندازه دانه و کیفیت آسیاب شدن
جو	ارقام متنوع	۱۴۸	۱۳۹	تعداد روز تا گلدهی، بیماری زنگ، ویروس کوتولگی زرد و اندازه لودیکول
سیب‌زمینی	ارقام متنوع	۱۲۳	۴۹	مقاومت به Late blight
برنج	ارقام بومی	۱۰۵		Glutinous phenotype
	ارقام بومی	۵۷۷	۵۷۷	کیفیت نشاسته
	نمونه‌های متنوع	۱۰۳	۱۲۳	عملکرد و اجزای عملکرد
<i>Pinustaeda</i>	جمعیت طبیعی و بدون ساختار لاین‌ها	۳۲	۲۱	Wood specific gravity, late wood
		۴۳۵	۲۸۸	زاویه میکروفیبریل و محتویات سلولز
نیشکر	کلون‌های متنوع	۱۵۴	۲۲۰۹	مقاومت به بیماری
اکالیپتوس	جمعیت طبیعی و بدون ساختار	۲۹۰	۳۵	زاویه میکروفیبریل
علف چاودار چندساله	ژرم‌پلاسم طبیعی	۲۶	۵۸۹	زمان گلدهی
	ژرم‌پلاسم طبیعی	۹۶	۵۰۶	زمان گلدهی و میزان قند محلول در آب



شکل ۳-۴ مراحل مختلف انجام تجزیه مکان‌یابی ارتباطی.

یکی از نرم‌افزارهای مورد استفاده جهت انجام تجزیه ارتباطی، نرم‌افزار TASSEL است که در آن تجزیه ارتباطی با استفاده از مدل خطی عمومی^۱ و یا مدل خطی مخلوط^۲ انجام می‌شود. اگر مدل خطی عمومی برای تعیین ارتباط نشانگر- صفت استفاده شود، فقط ماتریس Q که نشان‌دهنده ساختار جمعیت است، در محاسبات وارد می‌شود و روابط خویشاوندی بین افراد در نظر گرفته نمی‌شود. مکان‌یابی ارتباطی با مدل خطی مخلوط نیازمند محاسبه ماتریس K (نشان‌دهنده روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت) است که با استفاده از داده‌های ژنوتیپی در این نرم‌افزار انجام می‌گیرد و سپس ارتباط بین نشانگر- صفت به همراه احتمال اشتباه نوع اول محاسبه می‌شود. امروزه برای تجزیه ارتباطی از نرم‌افزارهای مختلفی استفاده می‌شود که برخی از مهمترین آنها در جدول ۳-۳ ارائه شده است.

1. Generalized Linear Model (GLM) 2. Mixed Linear Model (MLM)

جدول ۳-۳ بسته‌های نرم‌افزاری متداول مورد استفاده در تجزیه/مکان‌یابی ارتباطی

بسته نرم‌افزاری	زمینه مطالعاتی	وبسایت	ملاحظات
TASSEL	تجزیه ارتباطی	www.maizegenetics.net	رایگان، تجزیه عدم تعادل پیوستگی و تجزیه ارتباطی
STRUCTURE	ساختار جمعیت	pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html	رایگان، تجزیه ساختار جمعیت
SPAGeDi	روابط خویشاوندی	www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/spagedi.html	رایگان، تجزیه روابط خویشاوندی
EINGENSTRAT	تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه ارتباطی	http://genepath.med.harvard.edu/~reich/Software.htm	رایگان، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای تعیین ساختار جمعیت
SAS	عمومی	www.sas.com	رایگان، نرم‌افزاری متداول برای تجزیه‌های آماری
R	عمومی	www.r-project.org/	رایگان، نرم‌افزاری مناسب برای مطالعات شبیه‌سازی و افراد آشنا به برنامه‌نویسی
MTDFREM	مدل خطی	http://aipl.arsusda.gov/curtvt/mtdfrem.html	رایگان، تجزیه مدل مخلوط و کاربردی در برنامه‌های بهنجاری گیاهان و جانوران
ASREML	مدل خطی	www.vsni.co.uk/products/asreml	رایگان، تجزیه مدل مخلوط و کاربردی در برنامه‌های بهنجاری گیاهان و جانوران

منابع منتخب

- Breseghello, F. and Sorrells, M. E. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science*, 46: 1323-1330.
- Doerge, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics*, 3: 43-52.
- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M. and Buckler, E.S. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 357-374.
- Myles, S., Peiffer, J., Brown, P. J., Ersoz, E. S., Zhang, Z., Costich, D. E. and Buckler, E.S. 2009. Association mapping: Critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell*, 21: 2194-2202.

۴. گزینش به کمک نشانگر (MAS)^۱

۴-۱ مقدمه

روش‌های اصلاح گیاهان براساس گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب از جمعیت‌های طبیعی و یا درحال تفرق حاصل از تلاقی والدین مدنظر می‌باشد. بنابراین، گزینش دقیق نتاجی با ترکیب‌های آللی مناسب ژن‌های والدینی می‌تواند تولید ارقام جدید را تسریع کند. در روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات، به‌نژادگران اغلب با گزینش والدینی با صفات دلخواه مانند عملکرد، مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تلاقی آنها و گزینش نتاجی با خصوصیات مطلوب، ارقام جدید گیاهی را تولید می‌کند. اگرچه بیشتر ارقام گیاهی موجود نتیجه چنین فرایند اصلاحی می‌باشند ولی این در این روش تولید یک رقم تجاری حدود ۱۵-۱۰ سال طول می‌کشد، بنابراین، تسریع این فرایند و بهبود کارایی گزینش کمک بزرگی به تولید ارقام جدید خواهد کرد. ابداع و توسعه انواع نشانگرهای مولکولی در دهه‌های اخیر و وجود انواع روش‌های مکان‌یابی ژنی و شناسایی جایگاه ژنومی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی به کمک نشانگرهای پیوسته با آنها، امکان شناسایی ژنوتیپ‌هایی با بلوک‌های ژنی مطلوب را با کارایی بالا و در زمان کوتاه‌تر فراهم کرده است. فناوری استفاده از نشانگرها برای شناسایی ژنوتیپ‌هایی با ژن‌های مطلوب و یا بازیابی ژنوم والدین در نتاج حاصل از تلاقی، گزینش به کمک نشانگر (MAS) نامیده می‌شود.

گزینش به کمک نشانگر، گزینش افراد براساس الگوی ژنوتیپی (نشانگری) آنها به‌جای گزینش با استفاده از صفات فنوتیپی (گزینش فنوتیپی) می‌باشد که علاوه بر کاهش زمان گزینش، دقت گزینش را نیز افزایش می‌دهد. اصطلاح MAS به‌طورکلی در موارد زیر به کار می‌رود:

1. Marker assisted selection

- انتقال صفت به کمک نشانگر(ها) از طریق تلاقی های برگشتی از یک ژنوتیپ (والد بخشنده) به یک ژنوتیپ دیگر (والد گیرنده) با حفظ پایه ژنتیکی والد گیرنده. در این روش که تلاقی برگشتی به کمک نشانگر (MAB)^۱ نامیده می شود از دو گروه نشانگر استفاده می گردد. اینها شامل نشانگر(های) پیوسته با ژن موردنظر برای غربال آن در طی نسل های تلاقی برگشتی و نشانگرهایی برای بازیابی سریع ژنوم والد گیرنده طی ۳ تا ۴ تلاقی برگشتی می باشند.
 - غربال جمعیت های درحال تفرق طبیعی یا مصنوعی حاصل از تلاقی برای شناسایی ژنوتیپ هایی با ترکیبات ژنی مطلوب.
 - هرمی کردن^۲ ژن ها یا QTL ها، جهت تجمیع ژن های مقاومت به بیماری و یا QTL های از چندین ژنوتیپ در یک پایه ژنتیکی.
 - گزینش دوره ای به کمک نشانگر (MARS)^۳ در چندین نسل حاصل از تلاقی های خاص برای افزایش پیشرفت ژنتیکی.
 - گزینش براساس شاخص ترکیبی مولکولی و فنوتیپی. در این روش گزینش افراد براساس ترکیب خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی صورت می گیرد.
- شکل ۱-۴ شمای گزینش به کمک نشانگر را نشان می دهد.

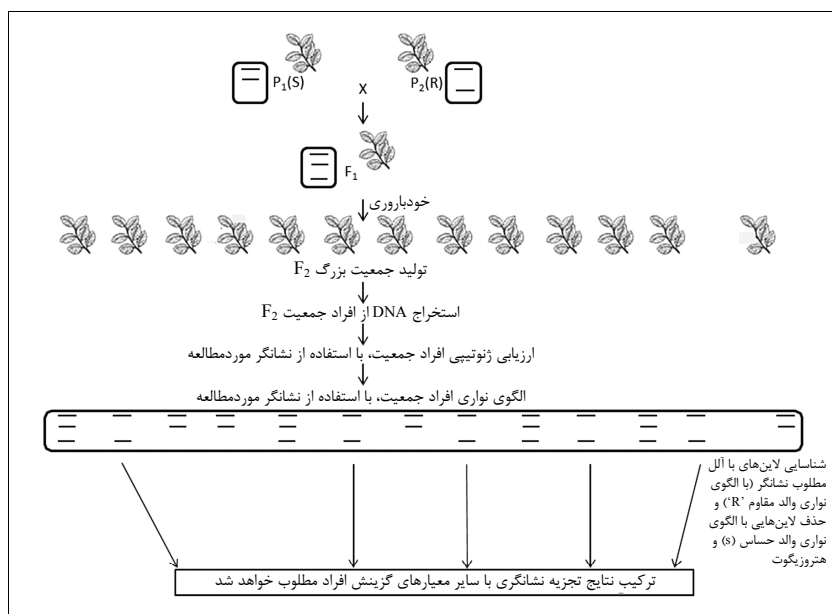
۲-۴ مزایای گزینش به کمک نشانگر

- گزینش به کمک نشانگر درمقایسه با گزینش فنوتیپی دارای مزایایی به شرح زیر است:
- صرفه جویی در زمان و هزینه به دلیل امکان ارزیابی در مرحله گیاهچه ای و جایگزین کردن آزمایش های مزرعه ای.
 - عدم تأثیر شرایط محیطی بر فرایند گزینش.
 - امکان گزینش برای آلل مغلوب در افراد هتروزیگوت که در گزینش فنوتیپی به علت عدم بروز این آلل در حضور آلل غالب امکان پذیر نمی باشد.
 - هرمی کردن ژن ها یا QTL ها.

1. Marker assisted backcrossing

2. Pyrimiding

3. Marker assisted recurrent selection



شکل ۴-۱ شمای گزینش به کمک نشانگر.

- شکستن پیوستگی‌های ژنی نامطلوب^۱ و جلوگیری از انتقال ژن‌های نامطلوب از والد بخشنده.
- گزینش صفاتی با وراثت‌پذیری پایین.
- حذف ارزیابی‌های غیرقابل اعتماد در آزمایش‌های مزرعه‌ای به علت اثرهای محیطی غیرقابل کنترل.
- آزمون صفات خاصی که ارزیابی فنوتیپی آنها امکان‌پذیر نیست (مانند محدودیت‌های قرنطینه‌ای که مانع استفاده عوامل بیماری‌زای خارجی برای غربال ژنوتیپ‌ها می‌شوند).
- گزینش برای ژن‌های نهفته در افراد حامل (هتروزیگوت‌ها) در طی نسل‌های تلاقی برگشتی.
- گزینش ترکیبات والدینی مطلوب برای حداکثرکردن هتروزیس.

1. Linkage drag

۳-۴ معایب گزینش به کمک نشانگر

گزینش به کمک نشانگر نیز مانند اغلب روش های مورد استفاده در برنامه های اصلاحی ممکن است دارای یکسری کاستی هایی باشد که مهمترین آنها عبارت اند از:

- برای برخی صفات به علت هزینه های اولیه لازم برای ایجاد زیرساخت، طراحی و سنتز آغازگر ... ممکن است MAS نسبت روش های کلاسیک اصلاحی صرفه اقتصادی نداشته باشد.
- نشانگرهای پیوسته با ژن (های) خاص در یک جمعیت ممکن است قابل استفاده در جمعیت های دیگر نباشند.
- اگر فاصله نشانگر از ژن یا QTL مدنظر بیشتر باشد به علت نوترکیبی بین ژن و نشانگر، احتمال خطای نوع اول بالا خواهد رفت. برای کاهش میزان احتمال خطای نوع اول توصیه می شود که فاصله نشانگر از ژن یا QTL بیش از ۵ سانتی مورگان نباشد و از دو نشانگر احاطه کننده ژن در گزینش به کمک نشانگر استفاده گردد.

۴-۴ تلاقی برگشتی به کمک نشانگر

یکی از کاربردهای اصلی گزینش به کمک نشانگر در برنامه های تلاقی برگشتی برای انتقال ژن (ها) از یک والد (والد بخشنده) به والد دیگر (والد گیرنده) است. با استفاده از روش های کلاسیک اصلاح نباتات، ۶ تا ۸ نسل تلاقی برگشتی برای بازیابی کامل ژنوم والد گیرنده همراه با انتقال ژن مدنظر لازم است. نسبت نظری ژنوم والد گیرنده بعد از n نسل تلاقی برگشتی برابر با $1/2^{n+1} - 2^{n+1}$ خواهد بود که در آن n تعداد تلاقی های برگشتی با فرض اندازه جمعیت نامحدود است. در روش تلاقی برگشتی معمول، درصد بازیابی ژنوم والد گیرنده بعد از هر نسل تلاقی برگشتی در جدول ۱-۴ ارائه شده است. درصد های ارائه شده در جدول برای جمعیت هایی با اندازه بزرگ صادق است. در جمعیت های اصلاحی که اندازه جمعیت کوچکتر است، درصدها معمولاً پایین تر از مقدار مورد انتظار برای جمعیت های بزرگ می باشند.

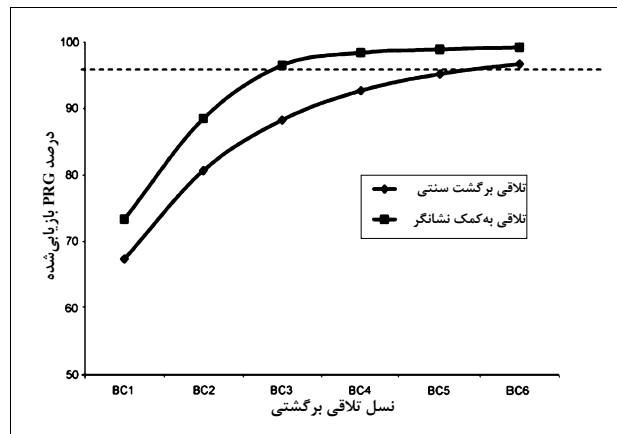
لازم به ذکر است که درصد ارائه شده در متوسط افراد جمعیت می باشد. به عنوان مثال، متوسط درصد ژنوم والد گیرنده بعد از تلاقی برگشتی اول در کل جمعیت حدود ۷۵ درصد

جدول ۱-۴ درصد بازیابی ژنوم والد گیرنده بعد از هربار تلاقی برگشتی

نسب	ژنوم والد دوره‌ای (%)
BC1	۷۵/۰
BC2	۸۷/۵
BC3	۹۳/۸
BC4	۹۶/۹
BC5	۹۸/۴
BC6	۹۹/۲

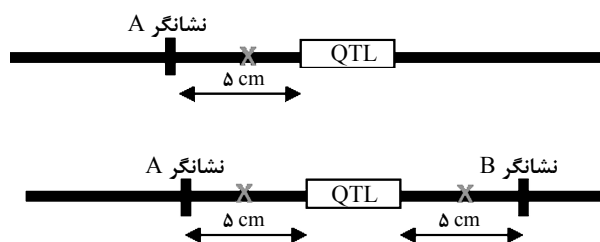
است، ولی برخی افراد درمقایسه با میانگین دارای درصد بیشتر و یا کمتری از ژنوم والد گیرنده می‌باشند. بنابراین، شناسایی نتاجی با درصد بیشتری از ژنوم والد گیرنده می‌تواند باعث کاهش تعداد نسل‌های تلاقی برگشتی برای ژنوم والد گیرنده باشد. برای این منظور، در MAB علاوه بر نشانگر یا نشانگرهای پیوسته با ژن QTL، از نشانگرهای چندشکل بین والد‌های بخشنده و گیرنده با توزیع یکنواخت در سایر کروموزوم‌ها (غیر پیوسته با ژن یا QTL) برای گزینش ژنوم والد گیرنده در نسل‌های تلاقی برگشتی استفاده می‌شود. بدین ترتیب، در هر نسل نتاجی با ژن انتقال یافته از والد بخشنده و درصد بیشتری از ژنوم والدگیرنده گزینش می‌شوند. در نتیجه به جای ۸-۶ نسل در روش کلاسیک، فقط ۴-۳ نسل برای انجام تلاقی برگشتی کافی خواهد بود.

شبیه‌سازی با استفاده از نرم‌افزار PLABSIM (برنامه کامپیوتری برای شبیه‌سازی نو ترکیبی‌ها در طی چرخه‌های میوزی) نشان داد که سرعت بازیابی ژنوم والد گیرنده با استفاده از نشانگرها به مراتب بیشتر از تلاقی برگشتی متداول است (شکل ۲-۴). بنابراین، گزینش به کمک نشانگرها درمقایسه با تلاقی برگشتی کلاسیک موجب صرفه‌جویی قابل ملاحظه‌ای در وقت می‌گردد. اگرچه در کوتاه مدت ممکن است هزینه اولیه تلاقی برگشتی به کمک نشانگر بیشتر از روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک باشد، ولی صرفه‌جویی در وقت در جهت معرفی سریع ارقام جدید می‌تواند منافع اقتصادی‌تر در پی داشته باشد.



شکل ۲-۴ نمودار شبیه‌سازی رایانه‌ای نرم‌افزار PLABSIM برای بازیابی ژنوم والد گیرنده (RPG) با استفاده از تلاقی برگشتی به کمک نشانگر (MAB) و تلاقی برگشتی معمول. کاهش در تعداد نسل‌های لازم برای دستیابی به نسبت معینی از ژنوم والد گیرنده با نقطه‌چین نشان داده شده است.

- نشانگرها به سه روش زیر در گزینش تک‌بوته‌ها در تلاقی‌های برگشتی مفید هستند.
- در گزینش آلل‌های هدف که ارزیابی فنوتیپی آنها با مشکل همراه است. به‌عنوان مثال، در گزینش آلل‌های مغلوب، هرمی کردن چند ژن مقاومت به بیماری در یک ژنوتیپ (پوشانده شدن اثر یک ژن توسط سایر ژن‌ها و عدم مشاهده در گزینش فنوتیپی)، آلل‌هایی که در محیط‌های گزینش بیان نشوند (به‌عنوان مثال، ژن مقاومت به یک بیماری در محیط عاری از عامل بیماری)، یا ژن‌هایی که ارزیابی فنوتیپی آنها گران‌تر از ارزیابی مولکولی باشد (مانند صفات مربوط به مراحل انتهایی رشد گیاه و یا مرتبط با کیفیت بذر).
- نشانگرها می‌توانند برای گزینش نتاجی با فراوانی خیلی کم که در آنها پیوستگی ژن هدف با ژن‌های نامطلوب شکسته شده است استفاده و منجر به تولید ژنوتیپ‌های حامل ژن هدف و فاقد ژن(های) نامطلوب اطراف آن شوند.
- نشانگرهای ناپیوسته با ژن هدف نیز در برنامه‌های تلاقی برگشتی به کمک نشانگر مفید هستند و امکان گزینش نتاجی با نسبت‌های بالاتر از نظر زمینه ژنتیکی والد گیرنده را فراهم می‌آورند.



شکل ۳-۴ کارایی گزینش برای یک QTL خاص براساس یک و یا دو نشانگر پیوسته با فاصله ۵ سانتی‌مورگان. کارایی گزینش با استفاده از یک نشانگر پیوسته برابر با $r_A = 95\%$ ، و یک جفت نشانگر احاطه‌کننده برابر با $r_{AB} = 99.5\%$ خواهد بود.

برای هر نتاج منتخب از تلاقی برگشتی، احتمال ازدست‌رفتن آلل هدف به‌علت نوترکیبی برابر r است. پس از t نسل تلاقی برگشتی، احتمال ازدست‌رفتن آلل هدف برابر $1 - (1-r)^t$ است. به‌عنوان مثال، اگر فراوانی نوترکیبی بین یک نشانگر و آلل هدف ۱۰ درصد باشد، آنگاه پس از سه نسل تلاقی برگشتی این میزان به ۲۷ درصد افزایش خواهد یافت. درخصوص نشانگرهای خیلی پیوسته مثلاً با ۱ درصد نوترکیبی پس از سه نسل تلاقی برگشتی احتمال ازدست‌رفتن آلل هدف فقط ۳ درصد خواهد بود. از آنجاکه احتمال شناسایی یک نشانگر با پیوستگی شدید به یک ژن، خیلی کم است، می‌توان از نشانگرهایی با فواصل بیشتر ولی در دوطرف آلل هدف به‌طور همزمان در گزینش به کمک نشانگر استفاده کرد تا احتمال ازدست‌رفتن آلل هدف در نسل‌های پیشرفته تلاقی برگشتی خیلی زیاد نشود. شکل ۲-۴ میزان خطای نوع اول درحالت استفاده از یک و دو نشانگر پیوسته با ژن را نشان می‌دهد. شکل ۳-۴ کارایی گزینش براساس یک و یا یک جفت نشانگر احاطه‌کننده QTL را نشان می‌دهد. مثال‌هایی از کاربردهای مهم نشانگرهای مولکولی در اصلاح گیاهان در جدول ۲-۴ آورده شده است.

۴-۵ تحلیل اقتصادی گزینش به کمک نشانگر

هزینه استفاده از ابزارها در برنامه‌های اصلاحی موضوع مهمی است. هزینه استفاده از گزینش به کمک نشانگر درمقایسه با اصلاح نباتات کلاسیک از مطالعه‌ای به مطالعه دیگر متفاوت

جدول ۲-۴ مثال‌هایی از کاربرد نشانگرها در اصلاح گیاهان

نام گیاه	استراتژی اصلاحی	هدف اصلاحی	نوع نشانگر	منبع
گندم	Introgression	مقاومت به آفات و بیماری	SSR, SCAR	Miedaner <i>et al.</i> (2006), Abdollahi Mandoulakani <i>et al.</i> , 2015
	تلاقی برگشتی به کمک نشانگر	مقاومت به آفات و بیماری	CAPS, AFLP, RFLP, STS	Helguera <i>et al.</i> (2005), Zhou <i>et al.</i> , 2005, Ali <i>et al.</i> , 2015
	هرمی کردن چند ژن مقاومت	مقاومت به بیماری	SCAR	Arati <i>et al.</i> , 2015
جو	Introgression, تلاقی برگشتی به کمک نشانگر	مقاومت به تنش غیرزیستی	SSR, SNP	Emebiri <i>et al.</i> (2009), Mora <i>et al.</i> , 2016
	هرمی کردن چند ژن مقاومت	مقاومت به آفات و بیماری	SSR, STS	Werner <i>et al.</i> (2005)
	دابل‌هپلوئیدی	عملکرد دانه	SNP, SSR	Wang <i>et al.</i> , 2016
ذرت	Introgression	عملکرد	RFLP	Bouchez <i>et al.</i> (2002), Beyene <i>et al.</i> , 2015
	تلاقی برگشتی به کمک نشانگر	صفات کیفی	SSR	Babu <i>et al.</i> (2004), Sureshkumar <i>et al.</i> , 2014
	اصلاح توده شیرین	مقاومت به آفات و بیماری	SSR	Puttarch <i>et al.</i> , 2016
برنج	ارزیابی ژرم‌پلاس	مقاومت به آفات و بیماری	SSR, STS,	Davierwal <i>et al.</i> (2001)
	تلاقی برگشتی به کمک نشانگر	مقاومت به آفات و بیماری	STS, RFLP	Chen <i>et al.</i> , 2000, Yap <i>et al.</i> , 2016
	Introgression	عملکرد	SSR	Ahn <i>et al.</i> (2003)
کلزا	اصلاح توده و هرمی کردن چند ژن مقاومت	مقاومت به تنش غیرزیستی	SSR	Ashraf and Foolad, 2012, Selvi <i>et al.</i> , 2015
	گزینش به کمک نشانگر	ژن برگشت‌دهنده باروری	STS	اکبری و همکاران (۱۳۹۵)
	گزینش به کمک نشانگر	مقاومت به بیماری	STS, SNP	نوروزی ۱۳۹۴, Norouzi <i>et al.</i> , 2015
سیب‌زمینی	Introgression	مقاومت به بیماری	STS, CAPS	Nie <i>et al.</i> , 2016, Kuhl <i>et al.</i> , 2016
لوبیا	گزینش به کمک نشانگر	مقاومت به بیماری	SCAR	نوشاد و همکاران (۱۳۹۵)

است. صرفه‌جویی در هزینه‌ها باید مورد به مورد مدنظر قرار گیرد. عواملی مانند وراثت صفت مورد نظر، روش ارزیابی فنوتیپی، هزینه‌های ارزیابی مزرعه‌ای، گلخانه‌ای و نیروی کار و هزینه منابع بر هزینه استفاده از نشانگرها مؤثر خواهند بود. برای برخی صفات ممکن است ارزیابی

فنوتیپی ارزان‌تر از گزینش به کمک نشانگر باشد، در صورتی که برای برخی دیگر، ارزیابی فنوتیپی ممکن است نیاز به روش‌های وقت‌گیر داشته و پرهزینه باشد. برخی مطالعات که در آنها از نشانگرها برای گزینش ژن‌های مقاومت به بیماری استفاده شده است نشان می‌دهد که بعد از بهینه کردن MAS، این روش از روش‌های سنتی مقرون به صرفه‌تر می‌باشد.

اقتصادی بودن روش گزینش به کمک نشانگر عمدتاً به چهارعامل زیر بستگی دارد:

- هزینه نسبی غربال فنوتیپی در مقایسه با غربال ژنوتیپی.
 - میزان صرفه‌جویی در زمان ارزیابی از طریق گزینش به کمک نشانگر.
 - اندازه و توزیع زمانی منافع حاصل از آزادسازی سریع ارقام اصلاحی جدید.
 - دسترسی به منابع مالی لازم جهت انجام گزینش به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی.
- عامل چهارم نشان می‌دهد که چرا شرکت‌های خصوصی سریع‌تر از مؤسسات دولتی و چرا برنامه‌های اصلاحی در کشورهای توسعه‌یافته سریع‌تر از کشورهای در حال توسعه، از گزینش به کمک نشانگر بهره‌برداری کرده‌اند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که گزینش به کمک نشانگر برای صفاتی مفید است که وراثت‌پذیری کمتر از ۵۰ درصد داشته باشند و یا در صورت وراثت‌پذیری بالاتر، هزینه ارزیابی فنوتیپی بیشتری در مقایسه با روش گزینش به کمک نشانگر داشته باشند.

جدول‌های ۳-۴ و ۴-۴ مثال عملی برای مقایسه هزینه‌های گزینش ۱۰۰ توده S₁ (فول‌سیب یا خانواده تنی) مقاوم به بیماری ویروسی ریزومانیا در چغندر قند را در طی سه سال به دو روش کلاسیک (ارزیابی مزرعه‌ای) و تلفیقی (نشانگر مولکولی و ارزیابی مزرعه‌ای) با فرض ۲۵ درصد حضور ژن مقاومت نشان می‌دهد. در این مثال از یک نشانگر بارز STS که پیوستگی نزدیکی با ژن مقاومت به ریزومانیا داشته است برای غربال مولکولی ژنوتیپ‌های فول‌سیب حامل ژن مقاومت استفاده شده است. در روش ارزیابی کلاسیک مزرعه‌ای با فرض ۲۵ درصد حضور ژن مقاومت و یافتن ۱۰۰ ژنوتیپ مقاوم نیاز به کشت حدود چهار برابر این تعداد مثلاً ۴۴۰ ژنوتیپ در مزرعه سلکسیون در سال اول (باتوجه به درصدی از تلفات و به ساقه نرفتن بوته‌ها) و کیج گذاری ۴۰۰ بوته در سال دوم برای تهیه بذر فول‌سیب است و در سال سوم آزمون مشاهده‌ای ۴۰۰ لاین فول‌سیب در مزرعه آلوده انجام می‌شود تا ۱۰۰ لاین مقاوم

جدول ۳-۴ هزینه‌های مصرفی (برحسب ریال) برای گزینش به روش ارزیابی مزرعه‌ای*

ردیف	نوع عملیات	هزینه واحد پرسنلی (ریال)	هزینه کل پرسنلی (ریال)	هزینه واحد مواد مصرفی (ریال)	هزینه کل مصرفی (ریال)
۱	کشت ۱۰۰ مترمربع برای گزینش	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰	۵۰۰۰	۵۰۰۰۰۰
۲	۴۴۰ عدد کیچ‌گذاری	۱۵۰۰۰۰	۶۶۰۰۰۰۰	۳۰۰۰۰۰	۱۳۲۰۰۰۰۰
۳	آزمون مشاهده‌ای ۴۰۰ توده S _۱	۵۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰	۸۰۰۰۰۰۰
۴	هزینه‌های متفرقه	---	۸۹۰۰۰۰۰	---	۱۴۵۰۰۰۰۰
۵	جمع هزینه	---	۹۵۰۰۰۰۰۰	---	۱۵۵۰۰۰۰۰۰
۶	جمع کل هزینه‌ها	دویست و پنجاه میلیون ریال			

جدول ۴-۴ هزینه‌های مصرفی (برحسب ریال) برای گزینش به روش تلفیقی ارزیابی مولکولی و مزرعه‌ای**

ردیف	نوع عملیات	هزینه واحد پرسنلی (ریال)	هزینه کل پرسنلی (ریال)	هزینه واحد مواد مصرفی (ریال)	هزینه کل مصرفی (ریال)
۱	کشت ۱۰۰ مترمربع برای گزینش	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰	۵۰۰۰	۵۰۰۰۰۰
۲	آزمون مولکولی ۵۰۰ بوته	۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰۰
۳	۱۱۰ عدد کیچ‌گذاری	۱۵۰۰۰۰	۱۶۵۰۰۰۰۰	۳۰۰۰۰۰	۳۳۰۰۰۰۰۰
۴	آزمون مشاهده‌ای ۱۰۰ توده S _۱	۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰۰۰
۵	هزینه‌های متفرقه	---	۳۵۰۰۰۰۰	---	۳۵۰۰۰۰۰۰
۶	جمع هزینه	---	۵۱۰۰۰۰۰۰	---	۴۹۰۰۰۰۰۰۰
۷	جمع کل هزینه‌ها	یکصد میلیون ریال			

* با تغییر درصد حضور ژن مقاومت مقدار هزینه‌ها در دو جدول تغییر می‌نماید.

** صرفه‌جویی اقتصادی روش تلفیقی (مزرعه‌ای و مولکولی) نسبت به روش ارزیابی مزرعه‌ای برای گزینش ۱۰۰ توده S_۱ مقاوم به ریزومانیا در طی سه سال، یکصد و پنجاه میلیون ریال و معادل کاهش ۶۰ درصد هزینه‌ها می‌باشد.

حاصل شود. درحالی‌که برای یافتن ۱۰۰ ژنوتیپ مقاوم در روش دوم که تلفیقی از روش مولکولی و مزرعه‌ای است تنها با کشت ۵۰۰ بوته از توده اصلاحی حامل ۲۵ درصد ژن مقاوم در مزرعه در سال اول و غربال آنها با نشانگر مولکولی به حدود ۱۰۰ بوته مقاوم می‌رسیم که تنها این بوته‌ها در زیر کیچ سال دوم بذر فول‌سیب تولید می‌کنند و در سال سوم آزمون مشاهده‌ای

آنها در مزرعه آلوده انجام می شود و به ۱۰۰ لاین فول سیب مقاوم دست می یابیم. بدین ترتیب در روش گزینش تلفیقی (ارزیابی مولکولی و مزرعه ای) نسبت به ارزیابی صرفاً مزرعه ای می توان حدود ۶۰ درصد در هزینه های تولید ۱۰۰ لاین فول سیب مقاوم به ریزومانیا در طی سه سال صرفه جویی کرد. در گزینش به کمک نشانگر هرچقدر فراوانی ژن مقاومت در جمعیت مورد نظر کمتر باشد ارزیابی مولکولی نسبت به ارزیابی فنوتیپی در مزرعه یا گلخانه آلوده برای یافتن تعداد مشخصی ژنوتیپ مقاوم به صرفه تر خواهد بود.

۴-۶ گرایشات آینده

مطالعات زیادی درباره تهیه نقشه QTL صفات مختلف در گونه های مختلف گیاهان زراعی صورت گرفته است اما عملاً تعداد نسبتاً کمی نشانگر در برنامه های اصلاح نباتات به کار گرفته شده اند. دلیل اصلی این امر آن است که نشانگرهای مورد استفاده در پیش بینی فنوتیپ مورد نظر قابل اعتماد نبوده اند. در بسیاری از موارد، این امر را می توان ناشی از پایین بودن دقت مطالعات مکان یابی QTL یا کافی نبودن معتبرسازی نشانگر دانست. تجربیات ارزشمندی که از تحقیقات گذشته به دست آمده است احتمالاً محققین بیشتری را برای توسعه نشانگرهای قابل اعتماد و متخصصین اصلاح نباتات را برای پذیرش گزینش به کمک نشانگر تشویق خواهد کرد. با این وجود، یونگ (Young, 1999) تأکید کرد که دانشمندان باید ضرورت استفاده از جمعیت های بزرگتر، داده های فنوتیپی دقیق تر، زمینه های ژنتیکی متفاوت و تأیید مستقل را درک نمایند تا بتوانند نشانگرهای قابل اعتمادی را برای گزینش به کمک نشانگر توسعه دهند.

عوامل دیگری از قبیل پیشرفت های جدید در تکنولوژی نشانگر، تلفیق functional genomics با مکان یابی QTL و در دسترس بودن نقشه های مترکم تر نیز وجود دارد که کارایی و تأثیرگذاری مکان یابی QTL و تحقیقات گزینش به کمک نشانگر را در آینده به طور قابل ملاحظه ای تحت تأثیر قرار خواهد داد.

گودارد و هیس (Goddard and Hayes, 2007) نوع دیگری از گزینش به کمک نشانگر را به نام گزینش ژنومی تعریف کردند که در آن تعداد زیادی از نشانگرها برای یک صفت

کمی به کار می رود به طوری که هر QTL با حداقل یک نشانگر در وضعیت عدم تعادل پیوستگی باشد.

راجسیک و همکاران (Rajacic et al, 2016) برای گزینش ژنومی، روابطی را با توجه به میزان وراثت پذیری صفت، تعداد قطعات کروموزومی مربوط به یک صفت و اندازه جمعیت مورد بررسی به دست آوردند که می تواند سودمندی گزینش ژنوتیپی در مقایسه با گزینش فنوتیپی را برای هر صفت اندازه گیری نماید.

منابع منتخب

- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-196.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363: 557-572.
- Manikanda Boopathi, N. 2013. *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection. Basics, Practice and Benefits*. © Springer India.

۵. گزینش ژنومی (GS)^۱

۵-۱ مقدمه

بیشتر صفات زراعی و اقتصادی در گیاهان مانند عملکرد دانه، تحمل به تنش‌های غیرزیستی و مقاومت به اغلب تنش‌های زیستی صفات پیچیده‌ای هستند که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند. معمولاً اثر تک‌تک ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفت کوچک است، ولی بین آنها اثر متقابل (اپیستازی) وجود دارد. کوچک بودن اثرهای ژنی و وجود اثرهای اپیستاتیک، عاملی محدودکننده برای پیشرفت در گزینش و بهنژادی صفات پیچیده می‌باشد. گزینش ژنومی شکلی از گزینش به کمک نشانگر می‌باشد که در آن از نشانگرهای سرتاسر ژنوم استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، کاربرد گزینش ژنومی در برنامه‌های بهنژادی گیاهان در کشورهای پیشرفته از طریق شتاب‌بخشیدن به پیشبرد نسل در حال تفرق و افزایش دقت گزینش، تولید ارقام جدید مناسب را تسریع کرده است. علاوه بر این، افزایش کارایی گزینش، امکان ارزیابی سریع را در مقیاس بزرگ فراهم می‌آورد. از طرف دیگر، پیشرفت در توالی‌یابی ژنوم و تولید نشانگرهای مبتنی بر چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) و روش‌های روباتیک برای ارزیابی فنوتیپی، هزینه ارزیابی‌های ژنوتیپی و فنوتیپی را کاهش داده است.

امروزه در برنامه‌های اصلاحی پیشرفته، ارزیابی فنوتیپی در حال فاصله گرفتن از روش‌های بهنژادی کلاسیک و بهنژادی تحلیلی^۲ است. روش‌های بهنژادی کلاسیک بر اندازه‌گیری مستقیم صفت مورد نظر (مانند عملکرد) تکیه دارد و بهنژادی تحلیلی به معنی گزینش صفت یا صفات کلیدی ثانویه (صفات غیر از عملکرد یا صفت مورد نظر) به منظور نتیجه‌گیری

1. Genomic selection
2. Analytical breeding

غیرمستقیم درمورد صفاتی مثل رشد کل گیاه، وضعیت آب و یا حتی عملکرد دانه با استفاده از روش‌های سنجش از راه دور است. به‌منظور غلبه بر مشکلات این دو روش، گزینش به کمک نشانگر (MAS) در سال‌های اخیر مدنظر قرار گرفته است. اگرچه روش گزینش به کمک نشانگر موفقیت‌هایی در برنامه‌های به‌نژادی اغلب گیاهان زراعی داشته است، ولی پیشرفت‌های حاصل کمتر از حد انتظار می‌باشد. عدم کارایی کامل MAS به دو دلیل می‌باشد: (الف) عدم استفاده از نشانگرهای توزیع شده در سراسر ژنوم، و (ب) عدم وجود ارزیابی فنوتیپی کامل و وسیع. بنابراین، محققین به این نتیجه رسیدند که پیشرفت تکنیک‌های مولکولی جهت اصلاح صفات کمی در صورتی مفید خواهد بود که همراه با ارزیابی فنوتیپی دقیق باشد. در این زمینه، بهره‌گیری از فناوری‌های روباتیک و نیز روند روبه رشد پیشرفت در روش‌های محاسبات، روش‌های ارزیابی فنوتیپی پربرون‌ده^۱ را به‌وجود آورده است، که یک جهش با هدف تغییر کاربردی ارزیابی فنوتیپی از هنر به فناوری ایجاد کرده است. در این راستا، در کنار مراحل تحلیل ژنومی و گزینش به کمک نشانگر که در آن برون‌سپاری^۲ (واردشدن اطلاعات به سیستم از بیرون) یک روند تثبیت شده است، ارزیابی فنوتیپی دقیق نیز به‌وسیله یک سرور کاربردی (www.phenofab.com; updated January 2012) پیشنهاد شده است. امکان ارزیابی فنوتیپی سریع‌تر و دقیق‌تر هزاران نمونه، در کنار کاهش هزینه‌ها و پیشرفت در فناوری‌های توالی‌یابی موجب می‌شود که گزینش ژنومی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهی دارای ارزش و اعتبار باشد. گزینش ژنومی توان و قدرت پیشگویی از طریق ژنوم را برای سازگاری ژنوتیپ فرد به یک محیط خاص محقق می‌کند.

۲-۵ مفهوم گزینش ژنومی

پروژه ژنوم انسان و پروژه‌های مرتبط، امکان توالی‌یابی کامل DNA ژنوم را برای گونه‌های مختلفی از حیوانات، گیاهان و میکروب‌ها فراهم کرده است. یک نتیجه مهم این توالی‌یابی‌ها، تعیین حدود صدهزار تا میلیون‌ها نشانگر SNP برای گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در دسترس بودن تعداد بسیار زیادی SNP در کنار فناوری‌های پُربرون‌ده و پُرسرعت،

1. High-throughput phenotyping

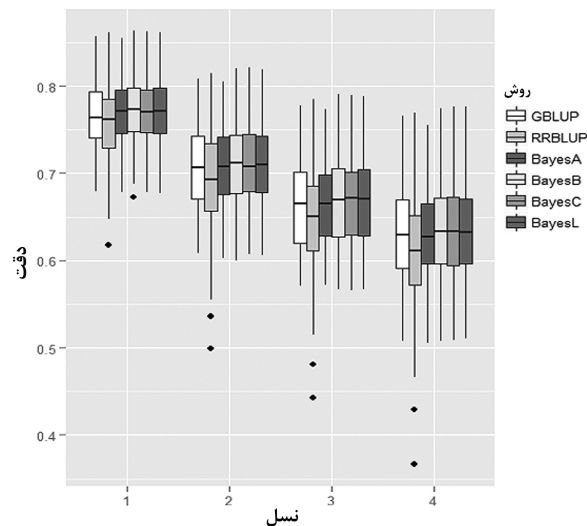
2. Outsourcing

تعیین ژنوتیپ افراد را بسیار سریع و آسان کرده است، به طوری که امروزه اطلاعات صدها هزار SNP به صورت تراشه های SNP توسط شرکت هایی مانند Illumina و Affymetrix در دسترس محققین قرار می گیرد. با فراهم شدن تراشه های SNP با تراکم هایی از ۳۰۰۰ تا ۸۰۰۰۰۰، روش گزینش ژنومی جایگزین روش های گزینش مرسوم مانند گزینش به کمک نشانگر شده است. گزینش ژنومی در حقیقت شکلی از MAS می باشد که در آن از نشانگرهای ژنتیکی توزیع شده در سرتاسر ژنوم، صرف نظر از پیوسته بودن و یا نبودن آنها، با ژن های کنترل کننده صفت مورد نظر استفاده می شود. در این روش، از تعداد زیادی نشانگر توزیع شده در سرتاسر ژنوم به طور همزمان برای برآورد ارزش اصلاحی افراد جمعیت استفاده می شود. هدف از گزینش ژنومی بهبود پیش بینی ارزش ژنتیکی افراد برای صفات مهم اقتصادی در برنامه های پیچیده به نژادی گیاهی و حیوانی است. گزینش ژنومی به جای تمرکز بر مدل های تجزیه و تحلیلی نشانگر واحد که فقط توانایی نشان دادن اثرهای بزرگ مربوط به آن نشانگر را دارند، سعی دارد یک توصیف ژنوتیپی از چندین نشانگر را داشته باشد تا بتواند اثرهای این نشانگرها (با توجه به کوچک یا بزرگ بودن اثر) را در یک مدل پیشگو ادغام کرده و با استفاده از مدل های جدید آماری به هدف خود نائل شود.

ارزیابی های ژنتیکی در سراسر ژنوم با ترکیب روش های آماری و داده های ژنومی، امکان پیش بینی ارزش اصلاحی ژنومی افراد را فراهم می کنند. شش روش آماری مختلف شامل بهترین پیش بینی نااریب خطی ژنومی (GBLUP)^۱، رگرسیون ریج (RR)^۲، بیز (BayesA)، بیز L، بیز C π و بیز B برای برآورد اثرهای نشانگر استفاده می شوند. هنوز مناسب ترین روش آماری برای ارزیابی های ژنومی موجود ارائه نشده است و چالش های زیادی مانند زیاده شدن پارامترهای برآوردی (اثرهای نشانگرهای متراکم، P) در مقایسه با تعداد مشاهدات (n) در این حوزه مطرح است. به عنوان مثال، با یک تراشه ۶۰۰۰۰ نشانگری و تعداد ۲۰۰۰ ارزش فنوتیپی در جمعیت مرجع با فرض وجود تنها اثرهای افزایشی، تعداد اثرهای نشانگری که بایستی برآورد شوند، ۳۰ برابر تعداد مشاهدات می باشد. بنابراین، در حل معادلات چند مجهولی به علت زیاده شدن تعداد مجهولات و محدود بودن تعداد معادلات، مشکل معکوس کردن ماتریس های

1. Genomic best linear unbiased prediction

2. Ridge regression

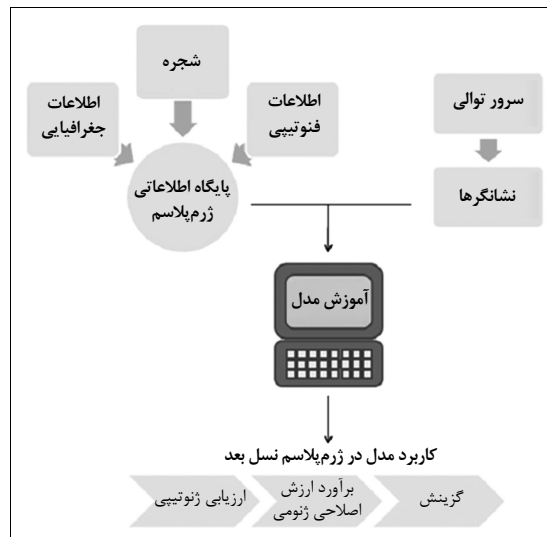


شکل ۵-۱ دقت برآورد ارزش‌های اصلاحی ژنومی با شش مدل طی چهار نسل. نقاط سیاه داده‌های پرت را نشان می‌دهند.

ضرایب در روش‌های آماری مانند حداقل مربعات (LS)^۱ پیش می‌آید و این ماتریس‌ها قابل معکوس شدن مستقیم^۲ نیستند. شکل ۵-۱ برآورد ارزش اصلاحی ژنومی را با استفاده از شش روش آماری فوق‌الذکر در طی چهار نسل (نسل اول افراد جمعیت مرجع و نسل دوم تا چهارم جمعیت تأیید) نشان می‌دهد.

شکل ۵-۲ مراحل اجرای گزینش ژنومی در یک برنامه به‌نژادی گیاهی را نشان می‌دهد. مدل‌های رگرسیونی پارامتری^۳ مورد استفاده در این روش، بررسی اثرهای نشانگر و مطالعه پاسخ‌های احتمالاً متفاوت نشانگرها در محیط‌های مختلف که ناشی از اثر متقابل ژن در محیط هستند را نیز امکان‌پذیر می‌سازد. به‌طور کلی، روش‌های انقباضی ییزین^۴ برای تشخیص نواحی کروموزومی یک آزمون مرتبط را انجام نمی‌دهند. ولی این روش‌ها معمولاً می‌توانند برای شناسایی QTL به کار روند.

1. LeastSquare
2. Direct inverse
3. Parametric regression models
4. Bayesian shrinkage methods



شکل ۵-۲ مراحل انجام گزینش ژنومی در یک برنامه بهنژادی.

اگرچه مدت چندسالی است که از مطرح شدن گزینش ژنومی می‌گذرد، گزارشات مرتبط با استفاده از گزینش ژنومی در گیاهان محدود است و اغلب مربوط به مطالعات شبیه‌سازی رایانه‌ای می‌باشند. عدم کاربرد وسیع گزینش ژنومی در برنامه‌های بهنژادی گیاهی تا حدودی می‌تواند ناشی از هزینه‌های بالای تعیین ژنوتیپ جمعیت‌های مورد استفاده به‌واسطه نیاز به تعداد بسیار زیاد نشانگرها در یک زمان باشد. در سال‌های اخیر، پیشرفت در زمینه فناوری‌های توالی‌یابی و کاهش هزینه ایجاد نشانگرها، امکان استفاده کارا از گزینش ژنومی را در حوزه گیاهی بیشتر کرده است. در این راستا، روش‌های تعیین ژنوتیپ که بر توالی‌یابی مستقیم برش ژنومی^۱ استوار هستند، با تکیه بر توالی‌یابی نسل بعد و فناوری‌های ارزان‌قیمت، هزینه‌ها را فوق‌العاده کاهش داده‌اند. این روش‌ها برای گونه‌های پلی‌پلوئید نیز که در زمان تعیین ژنوتیپ‌شان مشکلاتی در دورگ‌گیری و شناسایی چندشکلی به‌وجود می‌آید، با بهره‌وری کامل از توالی موردنظر، سودمند واقع شده‌اند. این روش‌های اخیر یک گام فراتر از توالی‌یابی مستقیم کل ژنوم هستند که برای یک مرتبه گزینش ژنومی مقرون‌به‌صرفه خواهند بود.

1. Genomic digests

از آنجاکه در حال حاضر در ایران دسترسی به اطلاعات واقعی ژنومی محدود است، شبیه‌سازی کامپیوتری با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی می‌تواند به عنوان ابزار در این زمینه استفاده شود. پیشرفت‌های اخیر که نتیجه توسعه فناوری‌های توالی‌یابی DNA و دردسترس بودن نشانگرهای متراکم گسترده در سرتاسر ژنوم می‌باشد، از جایگزین شدن گزینش به کمک کل ژنوم به جای گزینش کلاسیک و گزینش به کمک نشانگر خبر می‌دهد. اگرچه گزینش به کمک کل ژنوم در مراحل توسعه و بلوغ است، اما پیش‌بینی می‌شود این روش ارزیابی، روش ارزیابی مرجع در ژنتیک گیاهی، حیوانی و پزشکی شود.

۳-۵ نکاتی که قبل از انجام گزینش ژنوم باید به آن توجه کرد

- ارزش اقتصادی صفات،
- تعیین اندازه نمونه بهینه جمعیت مرجع^۱،
- استراتژی‌های مقرون‌به‌صرفه برای ارزیابی ژنوتیپی جمعیت،
- قابلیت اجرا در مزرعه،
- برآورد میزان درآمد در مقابل سود حاصل از افزایش پیشرفت ژنتیکی

۴-۵ مراحل انجام گزینش ژنومی

گزینش ژنومی در دو فاز کلی انجام می‌شود:

- فاز جمعیت مرجع: برآورد اثر نشانگرها در افراد جمعیت مرجع که دارای ارزش‌های ژنوتیپی و فنوتیپی است.
- فاز جمعیت تأیید^۲: پیش‌بینی ارزش‌های اصلاحی کاندیداهای گزینش شده در جمعیت تأیید که معمولاً با جمعیت مرجع رابطه خویشاوندی دارد و فاقد ارزش‌های فنوتیپی هستند.

۵-۵ معایب روش گزینش ژنومی

از محدودیت‌های اصلی به کارگیری گزینش ژنومی می‌توان به تعداد زیاد نشانگرهای موردنیاز و هزینه تعیین ژنوتیپ اشاره کرد که امروزه این دو محدودیت در اکثر گونه‌های دامی به دنبال

1. Reference population or training set 2. Validation set

طرح‌های توالی‌یابی ژنوم حیوانات اهلی و شناسایی حدود صدها هزار SNP همراه با پیشرفت‌های چشمگیر در فناوری‌های تعیین ژنوتیپ برطرف شده است. لازم به ذکر است که گزینش ژنومی نیز مانند سایر روش‌های گزینش مرسوم در کارهای اصلاحی دارای چالش‌هایی است که در زیر به برخی از آنها اشاره شده است:

- روش گزینش ژنومی یکی از بهترین روش‌ها در اصلاح گیاه و دام می‌باشد، ولی هنوز مدل آماری مناسب برای برآورد اثر SNP‌ها ارائه نشده است.
- وجود اثر متقابل ژنوتیپ و محیط. اثرهای نشانگری که در یک محیط خاص برآورد می‌شوند ممکن است با اثرهای نشانگری در محیط‌های دیگر متفاوت باشند.
- میزان پاسخ به گزینش حاصل از گزینش ژنومی در طولانی مدت ممکن است کمتر از گزینش کلاسیک باشد.
- با توجه به اینکه در جمعیت‌های مورد استفاده در گزینش ژنومی، عدم تعادل پیوستگی ممکن است علاوه بر ارتباط آلل‌ها در مکان‌های مختلف، ناشی از گزینش، جهش، مهاجرت، رانده‌شدگی تصادفی و سیستم‌های آمیزش غیرتصادفی باشد، بنابراین لازم است که هر سه نسل یک‌بار مجدداً اثرهای نشانگری در جمعیت مرجع برآورد شوند.

۵-۶ نتیجه‌گیری

گزینش ژنومی شکلی از MAS می‌باشد که در آن از نشانگرهای ژنتیکی که کل ژنوم را می‌پوشانند، استفاده می‌شود. از آنجا که در این روش برخلاف MAS که درصد کمی از واریانس ژنتیکی صفت قابل تبیین است به‌طور بالقوه‌ای همه واریانس ژنتیکی به‌وسیله نشانگرها تبیین می‌گردند، بنابراین، برآورد شده است که با این روش حدود ۹۲ درصد در هزینه‌های بهنژادی صرفه‌جویی خواهد شد. در نتیجه، این روش در کوتاه‌مدت باعث افزایش پاسخ به گزینش می‌گردد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به این نکته که گزینش ژنومی توانسته محدودیت‌های استفاده از MAS را برطرف سازد و حدود ۹۲ درصد در هزینه‌های برنامه‌های بهنژادی صرفه‌جویی حاصل کند، در آینده نه‌چندان دور این روش جایگزین روش‌های معمول بهنژادی خواهد گردید.

منابع منتخب

- Crossa, J., Pérez, P., De Los Campos, G., Mahuku, G., Dreisigacker, S. and Magorokosho, C. 2011. Genomic selection and prediction in plantbreeding. *Journal of Crop Improvement*, 25: 239-261.
- Daetwyler, H.D., Calus, M.P., Pong-Wong, R., DeLos Campos, G. and Hickey, J.M. 2013. Genomicprediction in animals and plants: simulation ofdata, validation, reporting, and benchmarking. *Genetics*, 193: 347-65.
- Rajsic, P., Weersink, A., Navabi, A., Pauls, K.P. 2016. Economics of genomic selection: The role of prediction accuracy and relative genotyping costs. *Euphytica*, 210: 259-276.

۶. کاربرد جهش‌های القایی در اصلاح نباتات

۶-۱ مقدمه

شاید یکی از مهمترین یافته‌ها در تاریخ علم ژنتیک، القای مصنوعی جهش‌ها به وسیله اشعه‌ها، مواد شیمیایی و یا ابزارهای زیستی باشد. فراوانی بالای جهش‌های القایی در ژن‌ها توسط اشعه‌های یونیزه کننده و برخی از مواد شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات (EMS)^۱، مطالعاتی را که انجام آنها با استفاده از جهش‌های طبیعی با فراوانی پایین امکان پذیر نبود، فراهم کرد. در نتیجه، درک اساس ژنتیکی بیشتر مکانیسم‌ها در موجودات عالی با استفاده از جهش‌های القایی از طریق مطالعه عملکرد ژن‌ها عملی گردید.

در نتیجه اهلی کردن گیاهان و در ادامه آن طی برنامه‌های بهنژادی مختلف انجام شده، تنوع و پایه ژنتیکی ژرم پلاسماهای اصلاحی به طور قابل توجهی کاهش یافت که این فرسایش ژنتیکی، گزینش برای انواع مختلف ژن‌های مطلوب در گیاهان را با مشکل مواجه کرد. در این راستا، استفاده از ابزارهای جهش‌زا برای القای جهش و ایجاد فرم‌های جدید ژنی به عنوان ابزاری کارآمد در برنامه‌های بهنژادی گیاهان مورد استفاده قرار گرفت. به طوری که بهنژادی به کمک جهش از دهه ۱۹۴۰ به صورت روشی متداول برای تولید گیاهانی با صفات بهبود یافته و تا به امروز به شکل جدید ادامه دارد.

1. Ethyl methanesulphonate

۲-۶ بهنژادی از طریق جهش^۱

اصطلاح «بهنژادی از طریق جهش» اولین بار در سال ۱۹۴۴ برای القا و تولید مصنوعی لاین‌های جهش‌یافته جهت استفاده در بهنژادی گیاهان ارائه گردید. یکی از دستاوردهای چنین برنامه‌هایی، تولید ارقام نیمه‌پاکوتاه گندم از طریق ایجاد ژن پاکوتاهی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا بود که به علت کلفتی و قوی‌بودن ساقه و مقاومت به خوابیدگی از کودپذیری بالایی برخوردار بودند، بنابراین عملکرد بالاتری نسبت به ارقام موجود داشتند. به‌طور کلی، هدف چنین برنامه‌های بهنژادی، ایجاد تنوع جدید در یک رقم (ارقام) زراعی از طریق جهش القایی و غربال آن برای تولید خصوصیات مطلوب در جهت بهبود برخی صفات ناخواسته آن(ها) می‌باشد. بذر بیشتر به‌عنوان ماده گیاهی مورد استفاده برای القای جهش استفاده می‌شود. گیاهان نسل اول حاصل از بذور تیمار شده با اشعه‌ها یا مواد جهش‌زا، نسل M_1 و نسل‌های بعدی حاصل از خودباروری M_1 به ترتیب نسل‌های M_2 ، M_3 ، M_4 و... خوانده می‌شود. در گیاهانی با تکثیر رویشی که در آنها اندام‌های رویشی برای جهش‌زایی تیمار می‌گردند، علائم MV_1 ، MV_2 ، MV_3 و... برای نشان‌دادن نسل‌های حاصل از جهش و SV_1 ، SV_2 ، SV_3 و... برای انواع تغییرات سوماکلونال حاصل مورد استفاده قرار می‌گیرد.

یک برنامه بهنژادی به کمک جهش شامل مراحل تولید، انتخاب و تأیید لاین‌های جهش‌یافته مناسب است. بدین ترتیب که در گام اول باید لاین‌هایی با صفات مطلوب جدید از میان تعداد زیاد افراد نسل M_2 انتخاب شوند. با توجه به اینکه در روش‌های کلاسیک، گزینش بر مبنای فنوتیپ صورت می‌گیرد و بروز فنوتیپی جهش تابع ژنوتیپ و محیط است باید بتوان جهش‌یافته‌های واقعی^۲ را از سایر لاین‌ها متمایز کرد. به‌عنوان مثال، اگر هدف ایجاد مقاومت به بیماری در یک رقم حساس به بیماری باشد، عدم بروز بیماری در برخی از افراد نسل حاصل از جهش ممکن است به علت عدم آلودگی آن ژنوتیپ با پاتوژن مربوطه و نه به علت ژن جهش‌یافته مقاومت به بیماری باشد. برای جلوگیری از چنین شرایطی توصیه می‌شود که برای تأیید جهش در ژن(های)، ژنوتیپ‌های جهش‌یافته در آزمایش(های) تکراردار تحت شرایط دقیق‌تر مورد بررسی قرار گیرند.

1. Mutation breeding

2. True mutation

۳-۶ خصوصیات ژنتیکی و اثرهای جهش‌های القایی

جهش‌های القاشده به‌طور فیزیکی یا شیمیایی دارای توزیع تصادفی در کل ژنوم و حتی درون یک مکان ژنی هستند. این خصوصیت، نه‌تنها امکان ایجاد جهش در هر بخشی از ژنوم یا هر ژنی را فراهم می‌کند، بلکه القای جهش‌های چندگانه را نیز در ژن هدف امکان‌پذیر می‌نماید. لازم به‌ذکر است که فراوانی و توزیع جهش‌های طبیعی و مصنوعی در ژنوم یکنواخت نیست و تابع ویژگی‌های فیزیکی و روابط ژنومی آن بخش می‌باشد. عملکرد جهش‌های حاصله تابع ابزار مورد استفاده برای القای آنها است. اغلب جهش‌های حاصل از پرتوتابی باعث غیرفعال‌شدن ژن جهش‌یافته می‌شوند و به‌صورت آلل مغلوب توارث می‌یابند. به‌طوری‌که فراوانی جهش‌های مغلوب القاشده با اشعه‌ها بین ۱۰-۹۰ درصد ولی فراوانی جهش‌های غالب بین ۶-۲۰ درصد گزارش شده است. اشعه‌ها می‌توانند انواع جهش‌ها شامل جهش‌های نقطه‌ای، حذف‌شدن‌ها، شکسته‌شدن و برگشتگی کروموزومی را القاء کنند. درحالی‌که جهش‌های القاشده توسط مواد شیمیایی اغلب از نوع جهش نقطه‌ای بوده و عملکرد متفاوت از آلل وحشی دارند و دارای توارث غالب یا همباز می‌باشند. اثر پلیوتروپیک (تأثیر یک ژن بر بروز بیش‌از یک صفت) نیز برای برخی از جهش‌ها گزارش شده است.

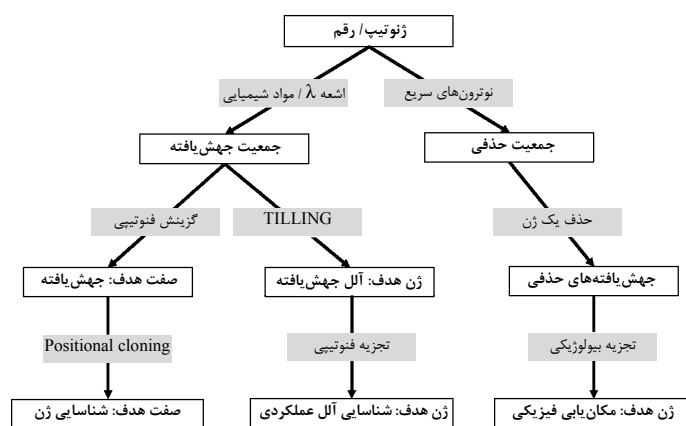
پیشرفت‌های اخیر در پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم در مقیاس وسیع، فرصت‌های جدیدی برای کاربرد تکنیک‌های مختلف مبتنی بر جهش‌های القایی و حتی طبیعی در مطالعات پایه و به‌نژادی گیاهان را فراهم کرده است. هدف اغلب این روش‌ها شناسایی و جداسازی ژن(های) کنترل‌کننده یک صفت براساس جهش(های) القایی یا طبیعی در آنها می‌باشد. بدین‌ترتیب که با ایجاد تغییر در ساختار ژن(ها) با استفاده از مواد یا ابزارهای جهش‌زا و بررسی ارتباط جهش‌های حاصله با تغییرات فنوتیپی صفت مدنظر، عملکرد ژن در کنترل صفت تعیین می‌شود. درحال حاضر، چنین روش‌هایی به‌طور وسیعی جایگزین روش‌های ژنتیک مستقیم^۱ در مطالعات تعیین عملکرد ژن‌ها گردیده است. در سال‌های اخیر با شناسایی «اجزای جابه‌جاشونده»^۲ مانند ترانسپوزون‌ها^۳ و رتروترانسپوزون‌ها^۴ و تعیین ساختار آنها در گیاهان

1. Forward genetics
2. Transposing elements
3. Transposons
4. Retrotransposons

مختلف و طراحی انواع سازه‌ها^۱ براساس T-DNA^۲، استفاده از جهش‌های درجی^۳ ایجاد شده توسط این ابزارهای زیستی در مطالعات ژنومیک عملکردی و نیز به‌نژادی گیاهی مولکولی رواج یافته است، به‌طوری که امروزه استفاده از جهش‌های القایی به‌عنوان روش‌های تعیین عملکرد ژن‌ها، ردیابی جهش در ژن موردنظر و تعیین ارتباط آن با تغییر(های) فنوتیپی حاصله در صفت در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و لاین‌های جهشی زیادی برای مطالعات پایه و به‌نژادی به‌خصوص در گیاهان مدل، مانند آراییدوپسیس و برنج و حتی گیاهانی با ژنوم بزرگ و پیچیده تولید شده است. به‌عنوان مثال، در حال حاضر در آراییدوپسیس هزاران لاین جهش‌یافته درجی T-DNA برای مطالعات مختلف دردسترس می‌باشد. ازطرف دیگر، مواد جهش‌زای شیمیایی نیز کاربرد جدیدی در مطالعات ژنومیک عملکردی و به‌نژادی، تحت عنوان تکنولوژی «هدف‌گیری تغییرات القایی موضعی در ژنوم‌ها»^۴ (TILLING) پیدا کرده‌اند و امروزه پروژه‌های TILLING در اغلب گیاهان مدل و زراعی جهت ایجاد جهش‌های عملکردی مهم برای استفاده در برنامه‌های تولید رقم در دست اجرا می‌باشند. RNA مداخله‌گر (RNAi)^۵ نیز در سال‌های اخیر به‌عنوان تکنیکی موفق برای تعیین عملکرد ژن‌ها از طریق تخریب ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. کاربرد جهش‌های القاشده توسط اشعه‌ها و مواد شیمیایی در ژنومیک عملکردی و به‌نژادی گیاهی در شکل ۱-۶ خلاصه شده است.

در اغلب مطالعات، برای ایجاد جهش‌های نقطه‌ای از مواد شیمیایی یا اشعه^۷ استفاده می‌گردد که جمعیت‌های حاصل را جمعیت جهشی یا جهش‌یافته^۶ گویند. چنین جمعیت‌هایی بیشتر برای ایجاد و شناسایی جهش‌های جدید ایجاد شده در ژن(های) کنترل یک صفت مورد استفاده قرار می‌گیرند. نوترون‌های سریع که موجب ایجاد حذف‌شدگی تا یک کیلوباز در مولکول DNA می‌شوند، برای تولید جمعیت‌های حذفی^۷ کاربرد دارد و این جمعیت‌ها برای شناسایی جهش‌یافته‌هایی با ژن(های) حذف شده در تهیه نقشه‌های فیزیکی استفاده می‌شوند.

1. Constracts
2. Constructs
3. Insertional mutation
4. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes
5. RNA interference
6. Mutated poulation
7. Deletion population



شکل ۶-۱ کاربرد جهش‌های القایی در ژنومیک عملکردی و بهنژادی گیاهی.

۶-۴ جهش‌های القایی در جی

القای جهش‌های در جی در ژنوم یا توسط اجزای خود ژنوم یعنی ترانسپوزون‌ها و رتروترانسپوزون‌ها و یا اجزای مهندسی‌شده بر مبنای T-DNA انجام می‌شود. القای جهش‌های در جی در راه‌انداز، «جایگاه‌های پیرایش»^۱ و «چارچوب قرائت آزاد»^۲ ژن باعث خاموشی، ژن هدف می‌گردد. درج DNA خارجی در ژن نه تنها سبب خاموشی آن می‌شود، بلکه با نشانمند کردن ژن، به عنوان یک نشانگر برای جداسازی ژن جهش‌یافته مورد استفاده قرار می‌گیرد. جهش‌های در جی در هر دوی مطالعات ژنتیک مستقیم و ژنتیک برگشتی^۴ کاربرد دارند. در آراییدوپسیس، ترانسپوزون‌ها و به خصوص T-DNA در سطح وسیعی برای ایجاد جهش‌های در جی در ژن‌های این گیاه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به اندازه کوچک اینترون‌ها و مواد بین ژنی بسیار کم در آراییدوپسیس، درج T-DNA ی با اندازه ۵-۲۵ کیلو باز به طور چشمگیری باعث اختلال در عملکرد ژن‌ها خواهد شد. بنابراین، در صورت وجود یک جمعیت بزرگ از لاین‌های در جی، شانس بالایی برای شناسایی لاین‌هایی با درج T-DNA در هر ژنی وجود خواهد داشت.

1. Splicing sites
2. Open reading fram
3. Taggaing
4. Reverse genetics

در حال حاضر، سازه‌های متعددی برای ایجاد جهش‌های درجی با استفاده از T-DNA در گیاهان مدل، مانند آراییدوپسیس و برنج، موجود می‌باشند که علاوه بر خاموشی ژن برای افزایش بیان ژن، جداسازی راه‌انداز و تقویت‌کننده^۱ نیز استفاده می‌شوند. ترانسپوزون‌ها نیز به‌طور وسیعی برای جداسازی ژن با ایجاد جهش‌های درجی در گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. سیستم‌های ترانسپوزونی متداول مورد استفاده در بیشتر مطالعات، سیستم‌های دوجزئی^۲ *Ac/Ds* و *En/Spm-dSpm*^۳ ذرت هستند که برای جداسازی ژن‌هایی مانند *Opaque-2*، *Chalcone synthesis*، *Alcohol dehydrogenase*، *Carotenoid biosynthesis* و *HC Toxin reductase* از ذرت استفاده شدند. این سیستم‌ها همچنین به‌عنوان ابزارهای هترولوگوس در برنج، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، کاهو، اطلسی، آراییدوپسیس و سویا به‌کار گرفته شده‌اند. به‌عنوان مثال، می‌توان به جداسازی ژن‌های *oscp96b4* (ژن نیمه‌پاکوتاهی) و *Osnop* (ژن بازدارنده تشکیل دانه گرده) از برنج و ژن *Cf-9*، عامل مقاومت به بیماری پوسیدگی برگ گوجه‌فرنگی ایجاد شده توسط قارچ *Cladosporium fulvum* با استفاده از سیستم‌های ترانسپوزنی ذرت اشاره کرد. استفاده از ترانسپوزون‌ها، نیازمند ایجاد جمعیت در حال تفرق حاصل از تلاقی والدینی با ترکیب مناسب از اجزای سیستم ترانسپوزونی مدنظر می‌باشد، ولی در استفاده از T-DNA به‌عنوان ابزار درجی نیاز به تلاقی نیست.

استراتژی جداسازی ژن توسط ترانسپوزن، شامل انجام تلاقی مناسب، مشاهده تغییرات فنوتیپی ایجاد شده در صفت مدنظر در نتاج حاصل از تلاقی، تولید نسل M_2 ، بررسی تغییرات صفت در افراد نسل M_2 ، انتخاب افراد جهش‌یافته هموزیگوت و ارزیابی ژنوتیپی آنها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ترانسپوزنی مربوطه براساس PCR معکوس و یا TAIL-PCR^۴ می‌باشد. در سیستم T-DNA نیز بعد از ایجاد جمعیت جهش‌یافته، غربال جمعیت در نسل M_2 برای شناسایی افراد جهش‌یافته هموزیگوت انجام و این افراد با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر دو انتهای T-DNA، ارزیابی ژنوتیپی می‌شوند.

-
1. Enhancer
 2. Activator/Dissociation
 3. Enhancer/Suppressor-Mutator
 4. Thermal Asymmetric Interlaced PCR

۵-۶ TILLING

در سال‌های اخیر چندین روش مانند نشانمند کردن ژن (ها) با T-DNA، ترانسپوزون‌ها و رتروترانسپوزون‌ها به‌عنوان ابزارهای جهش‌های درجی و خاموش کردن ژن براساس RNAi) در مطالعات مختلف ژنتیک برگشتی در گیاهان متعدد مورد استفاده قرار گرفته است. ولی این روش‌ها اغلب در گیاهانی با ژنوم‌های کوچک مانند آراییدوپسیس و برنج کارایی داشتند. علاوه‌براین، جهت استفاده از این روش‌ها وجود یک سیستم کارای تراریزش برای گیاه نیز الزامی می‌باشد. تکنیک TILLING که حدود یک‌ونیم دهه قبل به‌عنوان جایگزینی برای روش جهش‌زایی درجی در آراییدوپسیس ابداع شد، با غلبه بر بیشتر مشکلات روش‌های قبلی، امروزه به‌عنوان روشی قدرتمند در برنامه‌های به‌نژادی بیشتر گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته است و به‌عنوان یک روش غیرتراریخت از آن نام برده می‌شود.

این تکنیک از مزایای مواد شیمیایی جهش‌زا مانند اتیل‌متان‌سولفونات (EMS)، دردسترس بودن توالی ژن‌های گیاهان مختلف و روش غربال پُربرون‌ده^۱ برای تشخیص چندشکلی‌های نوکلئوتیدی در توالی هدف استفاده می‌کند. مزیت اصلی TILLING نسبت به سایر روش‌های ژنتیک برگشتی مانند روش‌های جهش‌های درجی و RNAi این است که می‌توان آن‌را در گونه گیاهی صرف‌نظر از اندازه ژنوم، سطح پلوئیدی و روش تولیدمثلی استفاده کرد. مواد جهش‌زای شیمیایی مورد استفاده در TILLING، فراوانی بالایی از جهش‌های نقطه‌ای را با توزیع تصادفی در ژنوم القاء می‌کنند. به‌عنوان مثال، تجزیه جهش‌های القایی در ۱۹۲ ژن آراییدوپسیس توسط EMS نشان‌دهنده وجود حدود ۱۰ جهش در هر ژن در یک جمعیت M₂ متشکل از ۳۰۰۰ گیاه می‌باشد. برآورد شده است که هر گیاه M₂ به‌طور متوسط حامل ۷۲۰ جهش خواهد بود. درحالی‌که با استفاده از درج T-DNA، به‌طور متوسط فقط ۱/۵ جهش به‌ازای هر لاین در جمعیت درجی آراییدوپسیس مشاهده شده است. بنابراین، درمقایسه با روش‌های جهش درجی، مانند T-DNA، جمعیت جهش‌یافته کوچکتری برای رسیدن به یک سطح اشباع از جهش لازم می‌باشد. به‌طوری‌که این تعداد در آراییدوپسیس، برای TILLING برابر ۵۰۰۰ گیاه M₁ درمقایسه با ۳۶۰۰۰۰ لاین درجی T-DNA است.

1. High-throughput

مزیت دیگر تکنولوژی TILLING، توانایی مواد جهش‌زای شیمیایی برای القای طیف وسیعی از جهش‌ها شامل تغییرات بدمعنی^۱، truncation و جهش در جایگاه‌های پیرایش می‌باشد. در مقایسه با جهش‌زاهای درجی که اغلب باعث خاموشی ژن هدف می‌شوند، در TILLING امکان القای یک‌سری از آلل‌ها در مکان ژنی هدف وجود دارد. علاوه بر «آلل‌های غیرعملکردی»^۲ (خاموش)، مواد جهش‌زای شیمیایی آلل‌های عملکردی^۳ و hypomorphic ایجاد کرده و یک محدوده فنوتیپی را برای صفت مورد مطالعه فراهم می‌کنند. به‌طوری‌که ذکر گردید، تکنولوژی RNAi و روش‌های مبتنی بر درج T-DNA و ترانسپوزون، متکی بر تراریزش ژنتیکی هستند، ولی در TILLING نیازی به تراریزش نمی‌باشد و تنها روش ژنتیک برگشتی قابل استفاده در گیاهانی است که در آنها تراریزش لازم نیست. استراتژی TILLING، ابتدا به‌عنوان یک روش پایش در ژنومیک عملکردی معرفی شد، ولی به‌زودی به ابزاری ارزشمند و جایگزین روش تراریخته در بهنژادی گیاهانی با تراریزش سخت و حتی در گیاهانی که تراریزش در آنها ساده است تبدیل گردید. تکنولوژی TILLING در تعداد زیادی از گیاهان زراعی مهم مانند برنج، گندم نان و دوبروم، ذرت، جو، سورگوم، سویا، کلزا، نخود، یولاف و گوجه‌فرنگی علاوه بر گیاه مدل آراییدوپسیس مورد استفاده قرار گرفته است.

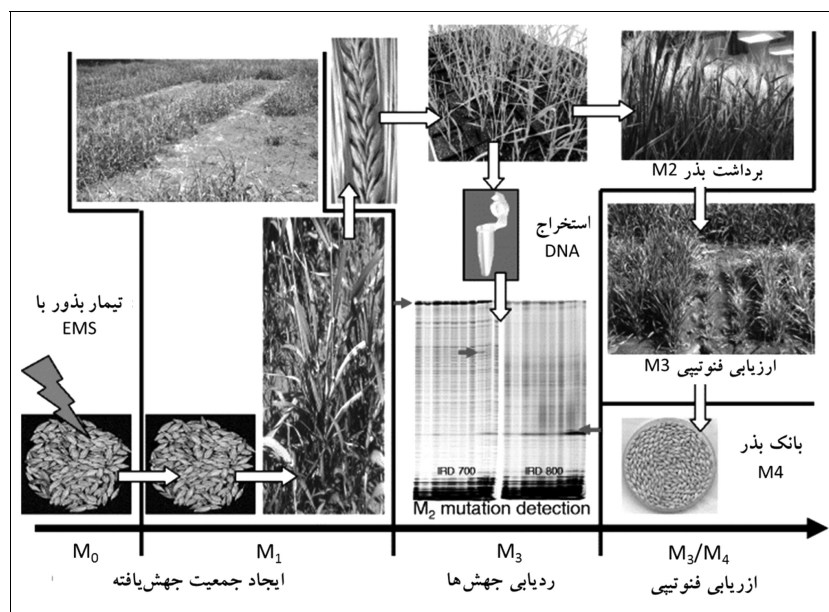
۱-۵-۶ روش انجام TILLING

پروتکل متداول برای انجام TILLING در گیاهان شامل مراحل زیر است (شکل ۲-۶):

۱. ایجاد جمعیت جهش‌یافته

- انتخاب ماده جهش‌زای مناسب.
- تیمار بذر ژنوتیپ یا رقم انتخابی با ماده جهش‌زا برای تولید نسل M_1 .
- خودباروری افراد نسل M_1 برای تولید نسل M_2 .
- استخراج DNA از افراد نسل M_2 .
- ادغام DNA ۵-۸ گیاه M_2 .
- برداشت بذر از گیاهان M_2 و تشکیل بانک بذر M_3 .

1. Missense
2. Loss-of-function alleles
3. Gain-of-function alleles



شکل ۲-۶ مراحل انجام TILLING.

۲. ردیابی جهش‌های ایجادشده در ژن (توالی) هدف

- انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از DNAهای ادغام‌شده براساس آغازگرهای اختصاصی ژن (توالی) هدف.
- ردیابی جهش‌ها با استفاده از روش‌هایی مانند برش با آنزیم‌های برشی خاص مانند *CEL1*، کروماتوگرافی فاز مایع با عملکرد بالای واسرشته‌ساز (DHPLC)^۱ و یا توالی‌یابی پُربرون‌ده.
- شناسایی گیاهان M₂ حامل جهش.
- توالی‌یابی قطعه ژن هدف برای تأیید جهش و تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی.

۳. ارزیابی فنوتیپی جهش‌یافته

زمانی که نمونه‌های DNA و بذر از یک جمعیت جهش‌یافته M₂ جمع‌آوری و نگهداری شد، آن جمعیت به‌عنوان یک جمعیت پایه TILLING جهت مطالعه جهش‌های القایی در ژن‌های

1. Denaturing high-performance liquid/chromatography

آن گونه خواهد بود. معمولاً برای TILLING، جمعیت‌هایی متشکل از ۵۰۰۰-۳۰۰۰ فرد M_2 ایجاد می‌شود، هرچند که جمعیت‌هایی با ۱۰۰۰۰ فرد نیز در برخی مطالعات گزارش شده است. تقریباً همه جمعیت‌های TILLING در گیاهان مختلف با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا تولید شدند که در بین آنها EMS ماده غالب مورد استفاده است.

در اولین تجربه TILLING در آراییدوپسیس، از DHPLC برای ردیابی جهش‌ها از طریق تشخیص هترو دوپلکس‌ها^۱ (جایی که به علت وقوع جهش جفت‌شدن بازها رخ نداده است) استفاده شد. ولی با گسترش کاربرد این روش به سایر گیاهان، متداول‌ترین روش برای ردیابی جهش‌ها، برش محصولات تکثیری با آنزیم *CEL1* است که DNA دو رشته‌ای را در جایگاه‌های هترو دوپلکس فقط در یک رشته برش می‌دهد و سپس گرم و سرد کردن محصولات برشی و تفکیک آنها در ژل پلی‌آکریلامید واسرشته‌ساز در سیستم LI-COR است. یک روش جایگزین برای سیستم LI-COR که در آن نیاز به آغازگرهای نشانمند شده با رنگ‌های فلورسانس که پُر هزینه می‌باشد، استفاده از ژل پلی‌آکریلامید غیرواسرشته‌ساز همراه با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید است که حساسیت مشابه با LI-COR را دارد.

۲-۵-۶ iTILLING^۲

در آراییدوپسیس، iTILLING به عنوان روش جدید TILLING جهت کاهش هزینه و زمان لازم برای غربال جهش ابداع گردید. در روش کلاسیک، گیاهان M_2 در خاک، کشت شده و DNA از تک تک گیاهان استخراج و برای انجام PCR، DNA چندین گیاه ادغام می‌شود. در iTILLING، بذرها از گیاهان M_1 به صورت بالک برداشت می‌گردند و نیازی به شماره گذاری گیاهان نمی‌باشد. سپس در هر حفره پلیت‌های ۹۶ تایی پُر شده با آگار، یک یا دو بذر M_2 برداشت شده از گیاهان M_1 کشت می‌گردد. انتهای حفره‌ها بریده شده است که امکان رشد ریشه‌ها را در حفره‌های پلیت دومی که در زیر پلیت اول قرار دارد و با آب پُر شده است، می‌دهد. تقریباً بعد از ۳ هفته، ریشه‌ها حفره‌های پلیت دوم را پُر می‌کند. این ریشه‌ها از گیاهچه‌ها جداسازی و بعد از فریز کردن جهت استخراج DNA استفاده می‌گردند و گیاهچه نیز بدون آسیب باقی می‌ماند. در iTILLING، از «تجزیه منحنی ذوب با تفکیک

1. Heteroduplexes
2. Individualized TILLING

بالا^۱» برای ردیابی جهش در قطعات تکثیری به‌جای برش آنزیمی و الکتروفورز ژل استفاده می‌شود. بعد از شناسایی جهش، گیاهچه حاوی ژن جهش‌یافته از پلیت ۹۶ تایی به گل‌دان حاوی خاک جهت تولید بذر و نسل بعدی برای ارزیابی‌های فنوتیپی منتقل می‌گردد.

۳-۵-۶ EcoTILLING

EcoTILLING یکی از اولین تغییر شکل‌های استراتژی TILLING است که برای ردیابی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) در جمعیت‌های طبیعی گیاهان می‌باشد. این روش برای اولین بار برای ردیابی چندشکلی در یک جمعیت وحشی مورد استفاده قرار گرفت و در آن به‌جای ادغام کردن DNA گیاهان جهش‌یافته و استفاده از آنها به‌عنوان الگو در PCR، DNA تک‌تک افراد جمعیت وحشی با DNA اکوتیپ Columbia به‌عنوان مرجع ادغام گردید. در این مطالعه، ۵۵ هاپلوتایپ برای پنج ژن در بیش از ۱۵۰ فرد شناسایی شد که هاپلوتایپ‌های دارای دامنه یک SNP تا هاپلوتایپ‌های پیچیده بودند. EcoTILLING تشخیص سریع تغییرات را در تعداد زیادی فرد امکان‌پذیر می‌کند و به‌علت اینکه فقط یک فرد برای هر هاپلوتایپ توالی‌یابی می‌شود، دارای هزینه پایین نیز است. این روش قابل استفاده در هر موجودی صرف‌نظر از هتروزیگوت یا پلی‌پلوئید آن می‌باشد. با استفاده از EcoTILLING، جمعیت‌های وحشی گیاهان مختلف برای شناسایی ژن‌های مفید مورد بررسی قرار گرفته‌اند. از جمله آنها می‌توان به ژن‌های *FAEI*^۲ کنترل‌کننده سنتز اروسیک‌اسید در گونه‌های Brassica، *Alk* رمزکننده soluble starch synthase IIa در برنج، *Pina-D1*^۳ و *Pinb-D1*^۴ تعیین‌کننده سختی دانه در گندم نان اشاره کرد.

منابع منتخب

- Hirschi, K.D. 2003. Insertional mutants: A foundation for assessing gene function. Trends in Plant Science, 8: 205-207.
- Kurowska, M., Daszkowska-Golec, A., Gruszka, D., Marzec, M., Szurman, M., Szarejko, I. and Maluszynski, M. 2011. TILLING - a shortcut in functional genomics. Journal of Applied Genetics, 52: 371-390.
- Shu, Q.Y., Forster, B.P. and H.Nakagawa. 2011. Plant Mutation Breeding and Biotechnology. FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy.

1. High-resolution melt curve analysis

2. *Fatty acid elongase 1*

3. *Purimidoline a*

4. *Purimidoline b*

This image shows a full page of a worksheet designed for handwriting practice. It features 18 horizontal dashed lines spaced evenly across the page, providing a guide for letter height and placement. The background is plain white, and there are no other markings or text present.

This image shows a full page of a worksheet designed for handwriting practice. It features 18 horizontal dashed lines spaced evenly across the page, providing a guide for letter height and placement. The background is plain white, and there are no other markings or text present.

[illegible]