مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

شناسایی و نقشه‌یابی QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با کیفیت دانه در جو

استادان راهنما:
دکتر محمود سلوکی
دکتر براتعلی سیاه‌سر

استاد مشاور:
دکتر مسیح فروتن

تهیه و تدوین:
سید مهدی سجادیان

مهر ۹۰

۹۰/۷/۲۵
۹۲۸۹

بسمه تعالی

دانشگاه زابل

مدیریت تحصیلات تکمیلی

صفحه الف

این پایان نامه با عنوان: « **شناسایی و نقشه یابی QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با کیفیت دانه در جو** » قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش **بیوتکنولوژی** توسط دانشجو **سید مهدی سجادیان** تحت راهنمایی اساتید پایان‌نامه آقای دکتر **محمود سلوکی** و آقای دکتر **براتعلی سیادسر** تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می‌باشد.

امضا دانشجو

این پایان نامه ۶ واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ۱۳۹۰/۷/ ۲۴ توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۱۹/۷ و درجه عالی به آن تعلق گرفت.

نام و نام خانوادگی	امضاء	تاریخ
۱- **استاد راهنمای اول :** دکتر محمود سلوکی		۱۳۹۰/۷/ ۲۴
۲- **استاد راهنمای دوم:** دکتر براتعلی سیاه سر		۱۳۹۰/۷/ ۲۴
۳- **استاد مشاور اول :** دکتر مسیح قروان		۱۳۹۰/۷/ ۲۴
۴- **استاد داور:** دکتر احمد قنبری		۱۳۹۰/۷/ ۲۴
۵- **نماینده تحصیلات تکمیلی:** دکتر علیرضا سیروس مهر		۱۳۹۰/۷/ ۲۴
۶- **مدیر گروه: (مهر و امضاء)** : دکتر مصطفی حیدری		۱۳۹۰/۷/ ۲۴

حمد و سپاس خدای را، آن نخستین بی پیشین را و آن آخرین بی پسین را، خداوندی را که دیده بینایان از دیدارش قاصر آید و اندیشه واصفان از نعت او فروماند. آفریدگان را به قدرت خود ابداع کرد و به مقتضای مشیت خویش جامه هستی پوشید و به همان راه که ارادت او بود روان داشت و رهسپار طریق محبت خویش گردانید. چون ایشان را به پیش راند، کس را یارای واپس گراییدن نبود، و چون واپس دارد، کس را یارای پیش تاختن نباشد. حمد و سپاس خداوندی را که اگر معرفت حمد خویش را از بندگان خود دریغ می داشت، در برابر آن همه نعمتها که از پس یکدیگر بر آنان فرو می فرستاد، آن نعمتها به کار می داشتند و لب به سپاسش نمی گشادند، به رزق او فراخ روزی می جستند و شکرش نمی گفتند.

به پاس تعبیر عظیم و انسانی‌شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان؛ به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است؛ به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گرایدو به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند:

این مجموعه را به پدر و مادر عزیز و بزرگوارم تقدیم می نمایم.

تقدیر و تشکر

اکنون که به یاری خداوند موفق به اتمام این پایان نامه شده‌ام ، جا دارد که با تمام وجودم از استادان گرانقدرم جناب آقای دکتر محمود سلوکی و جناب آقای دکتر براتعلی سیاه سر که با صبر و درایت خود همواره من را در قرار دادن در مسیر صحیح زندگی و تدوین و تنظیم این تحقیق ارشاد و یاری نموده‌اند و در کمال اخلاص و صداقت اندوخته گرانمایه علمی خود را در اختیار اینجانب قرار داده‌اند، از صمیم قلب سپاسگزاری کرده و از خداوند متعال موفقیت روز افزون ایشان را مسئلت می‌نمایم. از استاد مشاور محترم دکتر مسیح فروتن، که در این مدت من را یاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارم و موفقیت و کامیابی ایشان را از خداوند منان خواهانم. همچنین از ریاست محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل جناب آقای دکتر سید کاظم صباغ و کارشناس محترم پژوهشکده سرکار خانم مهندس حمیده خواجه تقدیر و تشکر می‌نمایم. از ریاست محترم پژوهشکده تالاب بین المللی هامون دانشگاه زابل جناب آقای دکتر مصطفی غفاری که در این راستا با اینجانب همکاری نمودند، سپاسگذاری می‌نمایم. از سرکار خانم فهیمه صادقی که در کلیه مراحل انجام این پایان نامه من را یاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایم. همچنین از دوستان عزیزم آقایان حسین کامیاب و مصطفی عابدی و تمامی عزیزانی که در طی انجام این پایان نامه با من همکاری و همدلی داشتند قدردانی می کنم.

سید مهدی سجادیان- مهرماه ۱۳۹۰

چکیده

جو یکی از محصولات مورد استفاده در تغذیه دام و همچنین تولید مالت است. به منظور شناسایی جایگاه‌های کنترل‌کننده برخی صفات کمی در جو و تعیین سهم هر QTL در تنوع فنوتیپی صفت مربوطه، ۷۲ لاین هاپلویید مضاعف جو به همراه والدین آن‌ها (استپتوئه و مورکس) با ۳ تکرار در شرایط بدون تنش مورد مطالعه قرار گرفت. صفات مورد بررسی شامل میزان آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و میزان عصاره مالت و قدرت دیاستاتیک عصاره بود. تجزیه‌های آماری شامل تجزیه واریانس، همبستگی بین صفات، به کمک نرم افزار آماری SAS و تجزیه QTL با استفاده از نقشه پیوستگی ژنتیکی حاصل از ۳۲۷ نشانگر مولکولی RFLP و نرم‌افزار QTL Cartographer به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) و تجزیه خوشه‌ای با کمک نرم افزار NTSYS انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد تفاوت معنی‌داری بین لاین‌ها در همه صفات مورد بررسی وجود داشت. اثر ژنوتیپ برای آلفا آمیلاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و قدرت دیاستاتیک مورد بررسی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و برای صفات آنزیم کاتالاز و عصاره مالت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. قدرت دیاستاتیک با آنزیم آلفا آمیلاز بیشترین مقدار همبستگی (۰/۶۷) را داشت. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد سه مؤلفه دارای مقدار ویژه بیشتر از یک داشته که مؤلفه اول ۳۰/۱۴ درصد از تنوع و مؤلفه دوم ۱۸/۹۸ درصد و مؤلفه سوم ۱۶/۶۶ درصد از تغییرات کل را توجیه نمودند. برای صفات مورد بررسی در مجموع ۲۷ QTL بدست آمد. واریانس فنوتیپی توجیه شده بوسیله این QTLها از ۶/۸ تا ۲۷/۱ درصد متغیر بود. بیشترین و کمترین واریانس فنوتیپی برای میانگین قدرت دیاستاتیک بدست آمد. واریانس فنوتیپی کل توجیه شده بوسیله این QTLها از ۶/۵ تا ۸۸ درصد برای قدرت دیاستاتیک بدست آمد. LOD در دامنه ۸/۳۵-۱/۹۶ قرار داشت. بیشترین و کمترین LOD به ترتیب برای QTLهای قدرت دیاستاتیک و صفت عصاره مالت بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: QTL، شناسایی جایگاه صفات کیفی، لاین‌های دابل هاپلوئید، جو

فهرست

عنوان.....صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه.....۲
۱-۲-کلیات.....۴
۱-۲-۱- تاریخچه ۴
۱-۲-۲- طبقه‌بندی و منشأ جو.....۵
۱-۲-۳- تعریف QTL ۶
۱-۲-۴- تجزیه QTL.....۷
۱-۲-۴-۱- مراحل انجام تجزیه QTL.....۷
۱-۲-۴-۲- تعیین آستانه در آزمون‌های فرض.....۸
۱-۲-۴-۳- تعیین حدود اعتماد برای یک QTL.....۹
۱-۲-۴-۴- جمعیت‌های مورد استفاده در مکان‌یابی QTLها.....۱۰

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- مطالعات انجام شده در زمینه تجزیه QTL برای صفات کمی مختلف.....۱۳
۲-۲- انتخاب به کمک نشانگر.....۲۲
۲-۳- مطالعات انجام شده در زمینه صفات مرتبط با کیفیت.....۲۳

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- زمان و محل انجام طرح.....۳۱
۳-۲- ارقام جو مورد استفاده.....۳۱
۳-۳- استخراج عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت.....۳۱
۳-۳-۱- بافر Ice-cold.....۳۱
۳-۳-۲- محلول‌های مورد نیاز جهت استخراج آنزیم‌ها.....۳۲
۳-۳-۳- تهیه عصاره آنزیمی.....۳۲
۳-۳-۳-۱- فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) ۳۲
۳-۳-۳-۲- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ۳۳
۳-۳-۳-۳- فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) ۳۳
۳-۳-۳-۴- فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) ۳۴
۳-۳-۳-۵- فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD).....۳۵
۳-۳-۳-۶- عصاره مالت (Malt extract).....۳۶
۳-۳-۳-۷- فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (Alpha amylase).....۳۷
۳-۳-۳-۸- قدرت دیاستاتیک (Diastatic power) ۳۸
۳-۴- آنالیزهای آماری.....۳۹

فهرست

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- تجزیه واریانس صفات ۴۳
۴-۲- همبستگی بین صفات ۴۵
۴-۳- تجزیه خوشه‌ای صفات ۴۸
۴-۴- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal component analysis) ۵۱
۴-۴-۱- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات مورد بررسی ۵۱
۴-۵- تجزیه QTL ۵۲
۴-۶- نتیجه‌گیری کلی ۶۰
۴-۷- پیشنهادها ۶۱
منابع ۶۲

فهرست جداول

جدول ۱-۳- محلول‌ها و غلظت‌های به کار برده شده برای سنجش آنزیم کاتالاز..... ۳۳
جدول ۲-۳- محلول‌ها و غلظت‌های به کار برده شده برای سنجش آنزیم آسکوربات پراکسیداز..... ۳۳
جدول ۳-۳- محلول‌ها و غلظت‌های به کار برده شده برای سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز..... ۳۴
جدول ۴-۳- محلول‌ها و غلظت‌های به کار برده شده برای سنجش آنزیم پلی فنل پراکسیداز..... ۳۴
جدول ۵-۳- غلظت، PH و حجم بافر مورد نیازبرای تهیه بافر استات سدیم..... ۳۵
جدول ۶-۳- محلول‌ها و غلظت‌های به کار برده شده برای سنجش آنزیم پراکسیداز..... ۳۶
جدول ۷-۳- توزیع نشانگرها در گروه‌های لینکاژی نقشه ژنتیکی جمعیت هاپلوئیدهای مضاعف جو حاصل از تلاقی استپتوئه و مورکس..... ۴۱
جدول ۱-۴- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ۷۴ لاین هاپلوئید مضاعف جو..... ۴۵
جدول ۲-۴- ضریب همبستگی بین کلیه صفات ژنوتیپ‌های جو هاپلوئید مضاعف مورد مطالعه..... ۴۷
جدول ۳-۴- مقادیر ویژه و میزان واریانس حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی روی صفات اندازه‌گیری شده ژنوتیپ‌های جو دابل هاپلوئید..... ۵۲
جدول ۴-۴- QTLهای ۸ صفت اندازه گیری شده۷۲ لاین هاپلوئید مضاعف جو..... ۵۵

فهرست شکل‌ها و نمودارها

شکل ۱-۴- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات کمی..... ۵۰
نمودار ۲-۴- نمودار بدست آمده از نرم‌افزار QTL مربوط به آنزیم پراکسیداز..... ۵۸
نمودار ۳-۴- نمودار بدست آمده از نرم‌افزار QTL مربوط به صفت عصاره مالت..... ۵۹

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه:

غلات یکی از مهم‌ترین منابع تولید مواد غذایی بشر است. در حدود ۵۵ درصد از پروتئین‌ها، ۱۵ درصد از لیپیدها و ۷۰ درصد از گلوسیدها و بطور کلی ۵۵-۵۰ درصد از کالری‌های مصرفی انسان از غلات تأمین می‌شود (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۷۷). کشت غلات از روزهای قدیم در ایران رایج بوده و به عنوان منبع اصلی غذا برای انسان و دام در نظر گرفته شده است. ۵۶ درصد از انرژی غذایی و ۵۰ درصد از پروتئین مصرفی مردم دنیا را ۸ غله (گندم، برنج، ذرت، جو، یولاف، چاودار، سورگوم و ارزن) تأمین می‌کنند (راشد محصل و همکاران، ۱۳۷۶). دانه جو هم در تغذیه انسان (سوپ جو، آرد جو و نان جو) و هم در تغذیه دام (علوفه) به کار می‌رود، عمده‌ترین موارد مصرف جو در تغذیه دام است که به عنوان غذای دام به اندازه ۸۰ تا ۹۰ درصد ذرت دانه‌ای ارزش غذایی دارد (امام، ۱۳۸۲). جو به صورت محصولات غذایی مالت دار مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به خواص و اهمیت غذایی مالت و فرآورده‌های حاصل از آن در پزشکی و صنایع داروسازی صنایع شیرینی‌پزی و نانوایی و صنعت نوشیدنی و نیز تهیه انواع الکل و غیره حائز اهمیت است (تاج بخش و همکاران، ۱۳۸۲).

مطالعه پیرامون نقشه‌یابی[1] و یا نشانمندکردن[2]، اطلاعاتی در مورد تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفت و محل این ژن‌ها در نقشه لینکاژ ارائه می‌دهد (Arif, 2002). زمانی که نشانگرهای ژنتیکی احاطه‌کننده یک QTL موجود باشند، آنگاه انتخاب بر اساس نشانگرها، انتخاب بر اساس ژنوتیپ خواهد بود و پاسخ به گزینش به حداکثر خود می‌رسد (Dudley, 1997). نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کمی (QTL) یکی از روش‌هایی است که در دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی توسعه

[1].Mapping
[2].Tagging

یافته است. در این روش تفرق همزمان صفت کمی و نشانگرهای مولکولی بررسی می‌شود و در نهایت تعداد ژن‌ها (عوامل مؤثر)، نوع عمل آن‌ها و میزان اثر هر یک برآورد شده و مکان QTLها روی ژنوم شناسایی می‌گردد. نقشه‌یابی QTL علاوه بر اطلاعات بسیار مفیدی که در زمینه جایگاه و تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی فراهم می‌کند، می‌تواند به‌نژادگران را در گزینش به کمک نشانگر یاری نماید، به علاوه اثر پلیوتروپی، اثر متقابل QTLها و نیز اثر QTL در محیط قابل بررسی است (Kato *et al.*, 2000; Liu, 1998).

تجزیه تکاملی (Stuber *et al.*, 1987; Sax, 1923)، نقشه‌یابی بازه‌ای (Knott and Hally, 1992; Lander and botestin, 1989) و نقشه‌یابی بازه‌ای مرکب (Zeng, 1994; Jansen, 1993) روش‌هایی هستند که در نقشه‌یابی QTL جهت بررسی ارتباط نشانگر و صفت کمی، معرفی شده‌اند، که مورد اخیر کامل‌ترین آن‌ها به حساب می‌آید. در نقشه‌یابی بازه‌ای مرکب، در بازه بین دو نشانگر اثر سایر نشانگرها به عنوان کوفاکتور یا نشانگر زمینه به صورت یک عبارت رگرسیونی وارد مدل می‌شود تا بخشی از واریانس صفت را که توسط QTLهای خارج از بازه مذکور توصیه می‌شود، حذف نماید (اثر زمینه ژنتیکی). در این روش QTLهای پیوسته قابل شناسایی هستند و برآورد اثرات QTLها و مکان آن‌ها ناریب است. اطلاع‌دهی و بازه‌دهی بیشتر، دقت، وضوح و توان آماری بالا از دیگر مزایای روش نقشه‌یابی بازه‌ای مرکب به شمار می‌رود (Liu, Zeng, 1994; 1998).

شناسایی نشانگرهای مولکولی کاملاً پیوسته با ژن مورد نظر و مکان‌یابی آن در روی کروموزوم یک هدف مهم در اصلاح نباتات برای کلون کردن ژن‌ها و گزینش به کمک نشانگر است (Arif, 2002).

در جو QTLهایی برای صفاتی نظیر عملکرد و اجزای عملکرد (Teulat *et al.*, 2001; Voltas *et al.*, 2001; Romagosa *et al.*, 1996) مقاومت به بیماری‌ها و آفات (Toojinda *et al.*, 2000;

Burnett *et al*., 1995) و مقاومت به تنش‌های محیطی (Cattivelli *et al*., 2002) مکان‌یابی شده-اند. در این تحقیق نیز به منظور شناسایی جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات کمی از دو رقم Steptoe و Morex و نتاج آن‌ها استفاده شده است. Steptoe دارای عملکرد بالا، سازگاری وسیع، حساس به خشکی، مقدار خواب بذر زیاد، حساس به بیماری نواری باکتریایی برگ، کیفیت علوفه بالا، شش ردیفه و تیپ تغذیه‌ای ساحلی بوده و Morex شش ردیفه، مقاوم به خشکی، کیفیت مالت و آمیلاز بالا، مقدار خواب بذر پائین و مقاوم به بیماری نواری باکتریایی برگ است (جباری، ۱۳۸۷)

بدین جهت در این تحقیق، اهداف زیر مدنظر بوده است.

۱-مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده صفات مرتبط با کیفیت در جمعیت دابل هاپلوئید جو.

۲-تعیین نشانگرهای مولکولی پیوسته با QTLها جهت استفاده در گزینش به کمک نشانگرها (MAS).

۳-تعیین همبستگی بین صفات و تولید اطلاعات کافی برای اصلاح‌گران نبات جهت آغاز یک پروژه انتخاب به کمک نشانگر برای صفات مرتبط با کیفیت.

۴-بررسی تنوع صفات کمی مرتبط با کیفیت بین لاین‌های مورد مطالعه.

۲-۱- کلیات:

۱-۲-۱- تاریخچه

جو از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است و پیشینه کشت آن به ۵ تا ۷ هزار سال پیش از میلاد می‌رسد (امام، ۱۳۸۲). مبدأ گیاه جو دقیقاً معلوم نیست و بر اساس تئوری هارلن، جد عمومی جو-های وحشی و جوهای اهلی یک نبات بوده که هم اکنون منقرض شده و در همان منطقه وسیعی که امروزه *Hordeum spontaneum* (جو وحشی) یافت می‌شود، می‌روئیده است. این منطقه از کوه‌های زاگرس در غرب ایران و سراسر جنوب ترکیه و به طرف جنوب تا فلسطین امتداد دارد (تاج بخش و همکاران، ۱۳۸۲).

تداخل ژنتیکی باعث افزایش تنوع ژنتیکی نیای وحشی جو شده است. در میان آن‌ها انواع گوناگونی از علف‌های هرز نیز وجود داشته که *H. spontaneum* از آن‌ها تکامل یافته است. بر اثر موتاسیون، جوهای زراعی دو ردیفه به نام *H. disticum* که محور خوشه‌اش محکم بوده ظهور یافته است. از آن پس فقط یک موتاسیون کافی بود تا جو شش ردیفه از جوهای دو ردیفه به وجود آید. هنگامی که کشت جو به مناطق آبی بین‌النهرین و مصر گسترش یافت، موتاسیون مکرر خود به خودی صورت گرفت که منجر به پیدایش جوی *H. vulgare* شد (تاج بخش و همکاران، ۱۳۸۲).

۲-۲-۱- طبقه‌بندی و منشأ جو

جو متعلق به جنس *Hordeum* بوده و گیاهی علفی یکساله یا چندساله است. ۳۱ گونه *Hordeum* وجود دارد که یکی از آن‌ها جو یکساله زراعی یا *Hordeum vulgare* می‌باشد (Nilan and Ullrich, 1993). حدود سه چهارم گونه‌های *Hordeum*، چندساله هستند (Bothmer *et al.*, 1995). جو زراعی شباهت زیادی به ژنوتیپ‌های وحشی *Hordeum spontaneum* دارد. *Hordeum spontaneum* را می‌توان به صورت *Hordeum vulgare* (L.) زیر گونه *Spontaneaus* طبقه‌بندی نمود. *Hordeum spontaneum* قادر به تلاقی با جو زراعی است. *spontaneum* *Hordeum* یکساله بوده و ساقه اصلی آن‌ها شکننده است. این جوها دو ردیفه، دیپلوئید $(2n=14)$ و خودگشن هستند. جوهای وحشی دیگر ممکن است تتراپلوئید یا هگزاپلوئید باشند. جوهای زراعی ۲ ردیفه یا ۶ ردیفه، دیپلوئید $(2n=14)$ بوده و ساقه محوری آن‌ها شکننده نمی‌باشند (امین‌فر، ۱۳۸۷). خاستگاه جو زراعی هلال حاصلخیز خاورمیانه گزارش شده است (Zohary and Hopf, 1988). شواهدی مبنی بر کشت جو اولیه در اتیوپی، تبت، افغانستان، هند و بالأخص خاور میانه گزارش شده است (Harlan, 1968). یافته های دیگر در این زمینه نشان داده است که بیشتر بقایای باستان‌شناسی بین سال‌های ۶۰۰۰ تا ۷۰۰۰ قبل از میلاد مربوط به اشکال دو ردیفه جو بوده و اشکال شش ردیفه آن تا قبل از سال ۶۰۰۰ قبل از میلاد مرسوم نبوده‌اند (Zohary, 1971).

۳-۲-۱- تعریف QTL

به علت کوچک بودن اثر ژن‌های صفات کمی و تغییرات محیطی، شناسایی و تعیین دقیق تعداد و محل قرار گیری آن‌ها در روی کروموزوم ممکن نیست و روش‌های مختلف تنها مناطقی از ژنوم را که احتمال حضور این ژن‌ها در آن‌ها بیشتر است را به صورت یک حدود اعتماد مشخص می‌کنند. بنابراین به جای اصطلاح ژن، از اصطلاح لوکوس صفت کمی[1] (QTL) برای آن‌ها استفاده می‌شود. در واقع QTL به قسمتی از ژنوم گفته می‌شود که روی صفت کمی تاثیر می‌گذارد و معمولا شامل تعداد بسیار زیادی ژن است که همه یا بعضی و یا گاهی حتی فقط یکی از آن‌ها به صفت کمی مربوط می‌شوند. یا به عبارت دیگر QTL قطعه‌ای از کروموزوم است که در بروز صفت کمی نقش دارد (امین‌فر، ۱۳۸۷).

با پیشرفت تکنولوژی و ابداع روش‌های مارکر مولکولی، به تدریج دانشمندان قادر شدند تا قسمت‌های مختلف ژنوم را علامت‌گذاری و نشانه‌گذاری کنند. همزمان با بیشتر شدن تعداد این نقطه‌ها، به تدریج بین آن‌ها لینکاژ دیده شده و راه برای تهیه نقشه‌های لینکاژی باز شد. دانشمندان از این فرصت جدید برای مکان‌یابی ژن‌های نسبتا کوچک اثر استفاده کردند. در روش-های جدید، دیگر لازم نبود که تعداد ژن‌ها را بسیار زیاد و اثرات آن‌ها را نامساوی در نظر بگیرند. همچنین، علاوه بر برآورد تعداد فاکتورهای مؤثر، امکان‌پذیر گردید که اثرات آن‌ها را هم دقیق‌تر و به صورت انفرادی بررسی کرد و با تعیین محل آن‌ها در ژنوم، این فاکتورها، به مفهوم ژن نزدیک‌تر می‌شدند. در روش‌های جدید امکان برآورد اثرات متقابل ژن‌ها هم به صورت دقیق‌تری موجود است (امین‌فر، ۱۳۸۷).

[1].Quntitative Trait Locus

۴-۲-۱- تجزیه QTL[1]

تعیین محل قرارگیری QTLها در ژنوم و برآورد اثرات آن‌ها روی صفت کمی به کمک نشانگرها را تجزیه QTL می‌گویند. تا همین اواخر، عقیده بر این بود که ساختار ژنتیکی یک صفت کمی از تعداد بسیار زیادی ژن، تشکیل شده که هر کدام از آن‌ها اثرات خیلی کوچکی روی صفت کمی دارند. در صورت صحت این عقیده دیگر تجزیه QTL هیچ جذبه‌ای نداشت، زیرا اطلاعات بدست آمده از شناسایی هر لوکوس قادر به جبران هزینه تلاش مصرف شده نمی‌توانست باشد. پس از توسعه نقشه‌های لینکاژی اشباع[2] شده به کمک نشانگرهای مولکولی چند شکل[3] دانشمندان بالاخره قادر به تفکیک ژنتیکی صفات کمی شدند و معلوم شد که کنترل ژنتیکی این صفات از آنچه که قبلاً تصور می‌شد خیلی ساده‌تر است (Paterson *et al.*, 1998). در واقع معلوم شد که در بیشتر موارد تعداد اندکی از لوکوس‌های ژنتیکی بخش بزرگی از واریانس مربوط به یک صفت را کنترل می‌کنند که دانشمندان را برای گزینش به کمک نشانگر ترغیب می‌کند (Flint and Mott, 2001). روش‌های تعیین محل QTLها ضرورتاً روش‌های آماری هستند. چون محل ژن مسئول صفت کمی به طور دقیق معلوم نیست، به کنایه به آن مه آماری[4] می‌گویند. از طرف دیگر، در مورد ژن‌های اصلی از روی درصد نوترکیبی آن‌ها با مارکرها می‌توان محل آن‌ها را دقیقاً معلوم کرد. در واقع حتی از ژن‌های اصلی به عنوان مارکر برای غنی‌تر کردن نقشه‌های لینکاژی استفاده می‌شود (کروژدهی، ۱۳۸۷).

۱-۴-۲-۱- مراحل انجام تجزیه QTL

۱-اجزای جمعیت برای صفت یا صفات کمی مورد نظر در شرایط مزرعه یا گلخانه نمره‌دهی می‌شوند (یادداشت‌برداری صفت یا صفات).

---

1. QTL analysis
2. Saturated linkage map
3. Polymorphic molecular marker
4. Statistical fog

۲-اجزای جمعیت از نظر مارکر مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاه بررسی می‌شوند (نقشه مارکری به روش مولکولی تهیه می‌شود).

۳-ارتباط بند اول و دوم بدست می‌آید (نقشه‌یابی QTL[1]) (کروژدهی، ۱۳۸۷).

۲-۴-۲-۱- تعیین آستانه در آزمون‌های فرض

در مکان‌یابی QTL، ما وجود QTL در محدوده مورد نظر را مورد آزمون قرار می‌دهیم که فرض-های H_0 و H_1 به صورت زیر می‌باشند.

QTL در ناحیه مورد نظر نیست (H_0:a=0 , d=0)

وجود QTL در ناحیه مورد نظر (H_1:a≠0 , d≠0)

برای آزمون فوق از آماره نسبت درستنمایی[2] (LR) استفاده می‌کنیم:

$$LR = -2\log\lambda = \frac{\sup_{\theta_0} L(\theta \mid Y, X)}{\sup_{\theta} L(\theta \mid Y, X)}$$

که θ_0 و θ به ترتیب فضاهای پارامتر محدود شده و محدود نشده می‌باشند. فرض صفر در صورتی رد می‌شود که آماره بدست آمده از مقدار آستانه که از قبل تعیین شده بزرگتر باشد.

در حقیقت مقادیر LR یا LOD[3] قدرت احتمال وجود QTL را بررسی می‌کند، به طوری که هر چه این مقادیر از نظر عددی بیشتر باشند، قدرت و احتمال وجود QTL درآن جایگاه بیشتر است. به طوری که نقطه ماکزیمم LOD، محتمل‌ترین و یا صحیح‌ترین محل QTL را روی نقشه نشان می‌دهد. در اینجا نیز مشکل تعیین حد آستانه معنی‌دار وجود دارد. آستانه مناسب بستگی به اندازه ژنوم و درجه اشباع مارکرهای ژنوتیپ شده دارد. تعیین ارزش آستانه LOD را برای یک کروموزوم شناخته شده و طول ژنتیکی معین را شرح داده‌اند. این افراد آستانه معمول LOD را بین ۲ و ۳

[1]. QTL mapping
[2]. Likelihood ratio
[3]. Logarithem of the odds ratio

جهت اطمینان ثابت ماندن اشتباه نوع I در سطح ۰/۰۵ برای تشخیص QTL پیشنهاد کرده‌اند (Lander and Botestin, 1989).

۳-۴-۲-۱- تعیین حدود اعتماد برای یک QTL

در تعیین مکان QTL بر روی کروموزوم، یکی از مهم‌ترین کمیت‌ها حدود اعتماد آن است (Darvasi, 1993). از آنجا که در تجزیه QTL از روش‌های آماری استفاده می‌شود، همواره محل یک QTL بطور تقریبی تعیین و پیشنهاد می‌شود، لذا برای هر QTL معرفی یک حدود اعتماد ضروری است. حدود اعتماد n درصد، فاصله‌ای است که در n درصد از مواقع پارامتر (QTL) را در بر می‌گیرد. Lander and Botestin در سال ۱۹۸۹ روشی را بر اساس حد توزیع کای اسکوئر آزمون درستنمایی بین دو نقطه پیشنهاد کردند. این ایده به یک فرمول ساده برای پیدا کردن حدود اعتماد منجر می‌شود. بزرگترین مقدار LOD مربوط به یک QTL را پیدا می‌کنیم و از آن مقدار c را کم می‌کنیم، تمام محل‌هایی (حول‌پیک QTL) که مقدار LOD آن‌ها از مقدار باقیمانده بزرگتر است حدود اعتماد را تشکیل می‌دهند. معمولاً برای c از مقادیر ۱ (Lander and Botestin, 1989)، ۱/۵ (Broman and Speed, 2002) و ۲ (Burke *et al*., 2002) استفاده می‌شود (با c=۱ حدود اعتماد ۹۶/۸٪ بدست می‌آید). Mangin و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که این روش برای QTLهایی که اثرات کوچکی دارند دقیق نیست، چرا که برای این گونه QTLها توزیع LOD از توزیع کای اسکوئر تبعیت نمی‌کند و لذا برای مثال احتمال حضور QTL در دامنه اعلام شده از مقدار مورد انتظار کمتر خواهد بود. Whittaker و همکاران در سال ۱۹۹۶ روشی را بر اساس تکنیک بوت استرپینگ پیشنهاد کردند که به نظر می‌رسد دقیق‌ترین روش ممکن برای تخمین حدود اعتماد باشد، لیکن نیاز به انجام شبیه سازی‌های خاص دارد. نرم‌افزارهای مختلف از جمله WinQTL Cartographer (Wang *et al*., 2001, 2004) قادر به انجام بوت استرپینگ هستند.

۴-۴-۲-۱- جمعیت‌های مورد استفاده در مکان‌یابی QTLها

عمده‌ترین جمعیت‌های تفرقی که برای مکان‌یابی QTLها و به طور کلی در نقشه‌یابی ژنتیکی استفاده می‌شوند، جمعیت F_2، جمعیت حاصل از تلاقی برگشتی[۱] (BC)، هاپلوییدهای مضاعف[۲] (DH)، لاین‌های اینبرد نوترکیب[۳] (RIL)، خانواده‌های تنی[۴] و خانواده‌های ناتنی[۵] هستند. در عمل این جمعیت‌ها دارای ارزش یکسانی نیستند و نسبت به یکدیگر دارای مزایا و معایبی می‌باشند. DHها و RILها جمعیت‌های ثابت و پایداری هستند که می‌توان آن‌ها را در هر زمان بدون تغییر ژنوتیپ رویاند و نشانگرهای مولکولی را به مرور به نقشه لینکاژی آن‌ها اضافه نمود. RILها احتمالاً معمول‌ترین و قابل اعتمادترین جوامع هستند، ولی تولید آن‌ها از نظر زمانی طول می‌کشد، چرا که عموماً به ۸ نسل خودگشنی احتیاج داریم. سهل‌الوصول‌ترین جمعیت‌های متفرق شونده، در درجه اول F_2 و بعد از آن BC می‌باشند، ولی در این دو جامعه ژنوتیپ‌ها تکرار نداشته و پایدار نیستند. DHها و RILها برای مطالعاتی که هدفشان مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مهم زراعی است، جمعیت‌های کاملاً ایده‌آلی به شمار رفته و اجازه تحقیق گسترده روی تنوع بین دو والد را می‌دهند (Austin and Lee, 1996). در این جوامع افراد هر خانواده خالص بوده و ژنوتیپ‌های یکسانی دارند و لذا هر ژنوتیپ قابل تکرار است. در این جوامع می‌توان نقشه‌های تهیه شده را به مرور زمان با نشانگرهای اضافی تکمیل‌تر کرد و به همین ترتیب، با اندازه‌گیری صفات مختلف در مکان‌ها و زمان‌های مختلف، اطلاعات به صورت تراکمی افزایش پیدا می‌کنند. برتری این جوامع نسبت به جوامع F_2 خصوصاً زمانی مشهود است که صفات کمی کنترل ژنتیکی پیچیده‌ای داشته

1. Back cross
2. Doubled haploid
3. Recombinant inbred lines
4. Full-sib families
5. Half-sib families