دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

پژوهشکده برنج و مرکبات

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم زراعی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M. Sc)
رشته مهندسی کشاورزی
گرایش اصلاح نباتات

موضوع:

نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کمی (QTL) اجزای عملکرد بر روی کروموزوم ^{7}D درگندم نان تحت شرایط استرس خشکی

استاد راهنما:
دکتر قربانعلی نعمت زاده
دکتر علاءالدین کردناییج

نام دانشجو:
نعیمه آشوری

شهریور ۱۳۸۹

چکیده

ژن‌ها و درصد نوترکیبی با توزیع غیر یکنواخت بالایی در ژنوم گندم یافت شده است. برای مثال بیش از ٪۸۵ از ژن‌ها در ۴۸ ناحیه‌ی غنی از ژن (GRRs) با تراکم و اندازه‌های مختلف قرار دارند که کمتر از ٪ ۲۹ از ژنوم گندم را شامل می‌شوند. تعیین ناحیه‌ی ژنی بویژه صفات مهم اگرونومیک شبیه عملکرد و اجزای آن و ژن‌هایی که پاسخ گیاه به استرس‌های غیر زنده از جمله خشکی و گرما را کنترل می‌کنند، می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای مطالعه‌ی بیشتر ژن‌های هدف به همراه شناختن واکنش بیولوژی فراهم کند، که اشاره کلی به ژن‌های کاندیدا دارد. بنابراین با مقایسه مطالعاتی که ژن‌های مشابه یا مکان‌های QTL مرتبط با صفات یکسان را معرفی کرده‌اند، می‌تواند درک عمومی از مکان‌های ژنوم هدف که بیشتر مورد مطالعه هستند را منجر شود. در مطالعات قبلی بیان شده که ژنوم D شامل QTLهای بسیار مهمی برای کنترل پاسخ گیاه به استرس محیطی می‌باشد. در این مطالعه ما تایید کردیم که کروموزوم ۷D می‌تواند به عنوان ناحیه‌ی غنی از QTL برای اجزای عملکرد تحت شرایط استرس خشکی مطرح شود. در نقشه‌ای مبنی بر نشانگرهای ریزماهواره و AFLP از لاین‌های اینبرد نوترکیب (F۲:۸)، این ناحیه سه گروه از QTLها را با LOD ۳/۲۸ تا ۵۷/۳۲ شامل می‌شود و میزان $R_۲$ از ۲۷ تا ۶۹ درصد نسبت زیادی از واریانس فنوتیپی را برای همه صفات بیان شده تحت استرس خشکی توجیه می‌کند.

کلمات کلیدی: گندم نان، ناحیه‌ای غنی از QTL، اجزای عملکرد، SSR وAFLP.

فهرست مطا لب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱ گندم و اهمیت آن ۲

۱-۲ ژنوم گندم ۲

۱-۳ اثر تنش خشکی بر گندم ۳

۱-۴ پاسخ گیاهان به تنش خشکی ۴

۱-۴-۱ پاسخ در سطح کل گیاه ۴

۱-۴-۱-۱ فرار از خشکی ۴

۱-۴-۱-۲ اجتناب از خشکی ۴

۱-۴-۱-۳ مقاومت به خشکی ۴

۱-۴-۲ پاسخ در سطح سلول ۵

۱-۵ مکان‌های ژنی کنترل کننده‌ی صفات کمی (QTL) ۵

۱-۶ اصول مکان‌یابی QTL ۷

۱-۶-۱ جمعیت‌های در حال تفکیک ۸

۱-۶-۱-۱ جمعیت F۲ ۹

۱-۶-۱-۲ جمعیت حاصل از تلاقی‌برگشتی ۱۰

۱-۶-۱-۳ جمعیت هاپلوئید مضاعف ۱۱

۱-۶-۱-۴ جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب ۱۲

۱-۶-۲ تفرق نشانگرها در جمعیت و نقشه پیوستگی ۱۳

۱-۶-۲-۱ اصول تهیه نقشه‌ی پیوستگی ۱۶

۱-۶-۳ روش‌های آماری قوی برای مکان‌یابی QTL ۱۸

۱-۶-۳-۱ مکان‌یا بی QTL به روش تجزیه تک نشانگری ۱۸

۱-۶-۳-۲ مکان‌یا بی QTL به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای ۱۹

۱-۶-۳-۳ مکان‌یابی QTL به روش نقشه‌یا بی فاصله‌ای مرکب ۲۱

۱-۶-۳-۴ مکان‌یابی QTL به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای چند گانه ۲۲

فصل دوم: بررسی منابع ۲۴

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۹

۳-۱ مواد گیاهی ۳۰

۳-۱-۱ مواد گیاهی مورد آزمایش ۳۰

۳-۱-۲ جمع آوری نمونه‌ی برگی ۳۱

۳-۲ ارزیابی فنوتیپی ۳۱

۳-۳ ارزیابی ژنوتیپی ۳۱

۳-۳-۱ استخراج ژنومی ۳۱

۳-۳-۲ تعیین کمیت و کیفیتDNA ۳۲

۳-۳-۳ نشانگرها ۳۵

۳-۳-۳-۱ نشانگر ریزماهواره ۳۵

۳-۳-۳-۲ نشانگر AFLP ۳۶
۳-۳-۴ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۳۶
۳-۳-۵ ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ۳۸
۳-۳-۵-۱ الکتروفورزآگارز ۳۸
۳-۳-۵-۲ الکتروفورز با ژل عمودی ۳۸
۳-۳-۵-۳ تیمار ظرف ژل ۳۹
۳-۳-۵-۴ تهیه ی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۳۹
۳-۳-۵-۵ رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره ۴۰
۳-۴ نمره‌دهی تصاویر ژل ۴۱
۳-۵ نقشه‌ی لینکاژ ۴۲
۳-۶ آنالیز QTL ۴۳
فصل چهارم: نتایج و تحث ۴۴
۴-۱ ارزیابی فنوتیپی ۴۵
۴-۲ ارزیابی ژنوتیپی ۴۶
۴-۳ ساختار نقشه‌ی پیوستگی ۴۶
۴-۴ آنالیز QTL ۴۶
۴-۴-۱ QTL های تعیین شده و ارزیابی آن‌ها ۴۷
۴-۴-۲ QTL برای عملکرد و اجزای عملکرد ۴۸
۴-۴-۲-۱ عملکرد دانه هر ده خوشه (Yld) ۴۹
۴-۴-۲-۲ وزن هزار دانه (TKW) ۴۹
۴-۴-۲-۳ تعداد دانه هر ده خوشه (Gps) ۴۹
۴-۴-۲-۴ تعداد خوشچه هر خوشه (Sps) ۵۰
۴-۴-۲-۵ طول خوشه (Sln) ۵۰
۴-۵ نتیجه گیری ۵۶
۴-۶ پیشنهاد ۵۸
منابع ۶۰

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱ مقایسه‌ی انواع نشانگرهای مولکولی DNA برای مطالعات ژنتیکی	۱۵
جدول ۱-۲ نسبت‌های مورد انتظار در نشانگرهای مختلف بسته به نوع جمعیت	۱۷
جدول ۳-۱ اسامی و مشخصات توالی نشانگرهای چندشکلی ریزماهواره	۳۵
جدول ۳-۲ اسامی و مشخصات توالی نشانگرهای AFLP پیوسته با نشانگرهای ریزماهواره	۳۶
جدول ۳-۳ مواد و غلظت نهایی برای انجام واکنش PCR	۳۷
جدول ۳-۴ پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	۳۷
جدول ۴-۱ ضرایب همبستگی بین صفات اگرونومیک تحت شرایط استرس خشکی در ایران	۴۵
جدول ۴-۲ مقایسه تایفون و طبسی انحراف معیار و وراثت‌پذیری صفات در جمعیت نقشه‌یابی در شرایط استرس خشکی در ایران	۴۵
جدول ۴-۳ خلاصه‌ای از QTLهای شناسایی شده بر روی کروموزوم ^{7}D به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل تلاقی تایفون و طبسی	۴۸

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ انتخاب والدین و توسعه جمعیت نقشه‌یابی ۸
شکل ۱-۲ شمایی از اصول مکان‌یابی QTL ۹
شکل ۱-۳ سیستم تلاقی گندم و ذرت و تولید دابل‌هاپلوئید ۱۱
شکل ۱-۴ شمایی از ساختار لاین‌های اینبرد نوترکیب ۱۳
شکل ۱-۵ شمایی از روش‌های آماری برای نقشه‌یابی QTL ۲۰
شکل ۳-۱ اختلاف فنوتیپی بین طبسی و تایفون برای تبیین QTLها ۳۰
شکل ۳-۲ تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی به روش الکتروفورز ژل آگارز ۳۵
شکل ۳-۳ بررسی نشانگرهای چندشکلی در والدین با گرادیان دمای اتصال ۳۶
شکل۳-۴ چندشکلی حاصل از نشانگر ریزماهواره در جمعیت نقشه‌یابی RILs حاصل تلاقی طبسی و تایفون بر روی ژل آگارز٪ ۲/۵ ۳۸
شکل ۳-۵ چندشکلی حاصل از نشانگر ریزماهواره در جمعیت نقشه‌یابی RILs حاصل تلاقی طبسی و تایفون بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۴۱
شکل ۳-۶ شمایی از نحوه‌ی نمره‌دهی به نشانگر ریزماهواره ۴۱
شکل ۳-۷ تهیه‌ی نقشه‌ی لینکاژ با استفاده از نرم افزار Joinmap ۴۲
شکل ۳-۸ آنالیز QTL به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب با استفاده از نرم‌افزار Windows QTL Cartographer ۴۳
شکل ۴-۱ نقشه‌ی پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار Joinmap ۴۷
شکل ۴-۲ آنالیز QTL برای عملکرد دانه بر روی کروموزوم $7D$ تحت شرایط استرس خشکی در ایران ۵۱
شکل ۴-۳ آنالیز QTL برای وزن هزار دانه بر روی کروموزوم $7D$ تحت شرایط استرس خشکی در ایران ۵۲
شکل ۴-۴ آنالیز QTL برای تعداد دانه بر روی کروموزوم $7D$ تحت شرایط استرس خشکی در ایران ۵۳
شکل ۴-۵ آنالیز QTL برای تعداد خوشچه در هر خوشه بر روی کروموزوم $7D$ تحت شرایط استرس خشکی در ایران ۵۴
شکل ۴-۶ آنالیز QTL برای طول خوشه بر روی کروموزوم $7D$ تحت شرایط استرس خشکی در ایران ۵۵
شکل ۴-۷ کلاستری از QTLها برای صفات مکان‌یابی شده در نزدیکی نشانگر ژنتیکی Xbarc۷۰ ۷۵

مقدمه و کلیات

۱-۱ گندم و اهمیت آن

گندم نان مهم‌ترین محصول زراعی در سرتاسر جهان است، مقدار تولید گندم در جهان ۱۰۰۰۰۰۰۰ تن و محصول برداشت شده در منطقه ایران ۴۷۵۰۰۰۰ هکتار و عملکرد آن ۲۱۰۵۲ هکتوگرم بر هکتار می‌باشد (فائو ۲۰۰۸). خشک‌سالی به‌عنوان پدیده طبیعی باعث کاهش عملکرد گندم و دیگر محصولات در مناطق با محدودیت آبی شناخته شده است. تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده‌ی عملکرد گندم مخصوصا در مناطق خشک و نیمه‌خشک مثل ایران می‌باشد. میزان خسارت ناشی از تنش خشکی در گندم با توجه به زمان و شدت خشک‌سالی و نیز انواع دیگر تنش‌های زنده و غیر زنده، بین ۱۰ تا ۹۰ درصد می‌باشد. تحت این شرایط نه تنها مصرف‌کنندگان جهان دچار ضرر می‌شوند بلکه این مسئله اثر اقتصادی بزرگی بر کشورهای صادر کننده گندم دارد.

شروع تحقیقات در مورد غلات در ایران به دهه‌ی ۱۹۳۰ بر می‌گردد. در آن زمان پژوهش‌گران، بذور واریته‌های محلی گندم و جو را که توسط کشاورزان در طی سال‌ها ایجاد شده و مورد استفاده قرار گرفته بودند، گردآوری نمودند. اگر چه بهبود روش‌های مدیریت زراعی مانند کنترل بیماری‌ها، بهبود سیستم‌های آبیاری و برنامه‌های به‌نژادی افزایش تولید گندم را به دنبال داشته اما نیاز به کارهای بیشتر در زمینه اصلاح این محصول به‌ویژه برای اقلیم‌های خشک کشور احساس می‌شود.

۱-۲ ژنوم گندم

گندم نان یکی از بزرگترین و پیچیده‌ترین ژنوم را در میان محصولات زراعی دارد، این گندم از آمیختگی ژنتیکی سه گونه‌ی دیپلوئید خویشاوند به گیاه آلوهگزاپلوئید با ژنوم AABBDD و فرمول ۲n=۶X=۴۲ به وجود آمده است. کل اندازه ژنوم گندم هاپلوئید تقریبا $۱۰^{۱۰} \times ۱/۷$ pb، حدود ۱۰۰ برابر ژنوم آرابیدوپس، ۴۰ برابر برنج و حدود ۶ برابر ذرت می‌باشد.

خصوصیات ژنتیکی و سیتوژنتیکی گندم دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید سهم عمده‌ای در درک تکامل گیاهان آلوپلوئیدی به همراه دارد. چنین ساختار ژنومی، گوناگونی ژنتیکی بالقوه قابل توجهی را فراهم می‌آورد و سازگاری و توزیع گندم را در سرتاسر جهان امکان پذیر می‌سازد. این پتانسیل ژنتیکی گندم به اصلاح‌گران گیاه این امکان را می‌دهد تا ژنوتیپ‌ها را برای همه نوع شرایط محیطی انتخاب نمایند. ژنوتیپ‌های موفق گندم که در طول قرن‌ها توسط کشاورزان تحت شرایط خشکی انتخاب شده‌اند، گواهی است بر این که تنوع زیادی در ژنتیک گندم وجود دارد و رفع این چالش را امکان‌پذیر می‌سازد [۵۰].

ژنوم D در گندم نان دارای پتانسیل ژنتیکی غنی می‌باشد که از گونه دیپلوئید *T. Tauschii* به گندم نان انتقال یافته است. در استرس خشکی کارایی استفاده از آب[۱] (WUE) نشان‌دهنده‌ی کارایی محصول برای مدیریت بر منابع آب است. کارایی استفاده از آب اغلب به بررسی تعیین اهمیت عملکرد تحت استرس و مقایسه تحمل مقاومت به خشکی محصولات

---

۱ -water use efficiency

زراعی با هم می‌باشد [۱۰]. با توجه به تحقیقات صورت گرفته، با تجزیه و تحلیل لاین‌های جایگزین ژنوم D مشخص شده است که کروموزوم 7D اثر مثبتی بر کارایی استفاده از آب را دارد [۱۶]. بنابراین کروموزوم 7D غنی از مکان‌هایی از ژن می-باشد که به پاسخ گیاه در شرایط خشکی منجر می‌شود.

۱-۳ اثر تنش خشکی بر گندم

گندم نان در بیشتر نواحی خشک و نیمه‌خشک جهان با تغییرات آب و هوایی زیاد، رشد می‌کند و مهم‌ترین عامل محدود کننده‌ی عملکرد آن در این نواحی کمبود آب می‌باشد [۲۶، ۲۲ و ۸۱]. در مراحل تکامل این گیاه زراعی ژنوتیپ‌های مختلفی از آن ایجاد شده که از نظر میزان مقاومت به خشکی متفاوت می‌باشند [۹۵ و ۶۹]. با توجه به این واقعیت که بخش عمده‌ای از سطح زیر کشت این گیاه در شرایط دیم می‌باشد و عملکرد در این شرایط نیز عمدتا وابسته به میزان بارندگی فصلی است لذا کمبود و تغییرات میزان بارندگی موجب تنوع سالانه عملکرد در این گیاه می‌شود [۴].

از میان همه‌ی تنش‌هایی که بهره‌وری محصول را کاهش می‌دهد، خشکی چالش برانگیزترین پدیده طبیعی در برابر تلاش‌های به‌نژادگران گندم می‌باشد [۸۹]. پیچیدگی این موضوع از تعداد و پیچیدگی عواملی که با پاسخ گیاهان به تنش خشکی مرتبط هستند، نشات می‌گیرد [۵۰]. هر چند که اثرات عمومی خشکی بر رشد گیاهان به خوبی شناخته شده‌اند، ولی اثرات اصلی کمبود آب در سطح مولکولی و بیوشیمایی بخوبی درک نشده اند [۱۸ و ۱۷]. از نظر اصطلاح شناسی، خشکی یک دوره‌ی زمانی امتداد یافته است که در آن زمان دسترسی گیاه به آب کمتر از نیازهای معمول در یک منطقه است. خشکی از نظر کشاورزی، نبودن رطوبت کافی در خاک برای رفع نیازهای یک گیاه خاص در یک زمان ویژه می‌باشد [۷۷]. از نظر عملی، مقاومت به خشکی بیشتر به محصول نهایی وابسته است تا به ظرفیت گیاه برای زندگی در شرایط با محدودیت آب [۸۹].

برای درک این تعاریف و نیز پیچیدگی‌های پاسخ به تنش، باید مکانیسم‌هایی که توسط آنها گیاهان می‌توانند به تنش‌ها پاسخ دهند مورد توجه قرار گیرند.

۱-۴ پاسخ گیاهان به تنش خشکی

پاسخ گیاهان به تنش خشکی معمولا به دو سطح کل گیاه و سطح سلولی طبقه‌بندی می‌شود.

۱-۴-۱ پاسخ در سطح کل گیاه

پاسخ‌های تنش در سطح کل گیاه به مکانیزم‌های فرار[۱]، اجتناب[۲] و مقاومت[۳] تقسیم می‌شوند [۱۸].

---

۱ - Escape
۲ - avoidance
۳ - tolerance

۱-۴-۱-۱ فرار از خشکی

فرار از خشکی به مفهوم کامل شدن چرخه زندگی گیاه پیش از بروز تنش شدید است. گیاهانی که از خشکی فرار می-کنند چرخه‌ی زندگی کوتاه و رشد سریع دارند. حداکثر استفاده از منابع آب در دسترس و تقسیم‌بندی بهتر فراورده‌های فتوسنتزی دو راهبرد عمده از مکانیسم فرار به شمار می‌آیند.

۱-۴-۱-۲ اجتناب از خشکی

اجتناب به معنای حفظ پتانسیل آب در بافت است تا جایی که گیاه خودش را با منابع آب و مواد معدنی محدود در شرایط تنش خشکی از طریق کم کردن میزان از دست دادن آب و حداکثر کردن جذب آب تطبیق دهد. در این مکانیسم، از دست‌دادن آب از طریق بسته شدن روزنه‌ها، کاهش سطح سلول با پیچش برگ، کم شدن جذب نور از طریق تغییر زاویه برگ، کاهش مساحت سایه اندازه برگ در نتیجه کاهش رشد، ریزش برگ‌های مسن‌تر در پاسخ اولیه به کمبود آب به حداقل می‌رسد. به‌علاوه، جذب بیشتر آب از لایه‌های عمیق خاک طی دوره‌ی خشکی با استفاده از سیستم ریشه‌ای عمیق‌تر امکان-پذیر است.

۱-۴-۱-۳ مقاومت به خشکی

مکانیسم مقاومت به توانایی گیاه برای مقاومت طولانی مدت به کم بودن آب در بافت گفته می‌شود [۸۷]. این مقاومت بطور عمده شامل تنظیم اسمزی[۱] که یکی از اساسی‌ترین فرآیندها در پاسخ گیاهی و سازگاری با کمبود آب بخصوص در دوره‌های طولانی مدت خشکی شدید می‌باشد. تنظیم اسمزی فعالیت متابولیک سلولی گیاهی را حفظ می‌کند تا گیاه آب کم را تحمل کند و گیاهان را قادر می‌سازد تا مجددا رشد کند. در طول مدت کمبود آب هدایت روزنه‌ای کاهش خواهد یافت تا اتساع غشاء پروتوپلاسم گیاهی حفظ شود. اتساع غشاء پروتوپلاسم گیاهی برای توسعه سلول ضروری است [۵۰].

۱-۴-۲ پاسخ در سطح سلول

در سطح سلول، گیاهان به محرک‌های خارج سلولی از جمله کمبود آب از طریق مسیر عبور سیگنال[۲] سلول پاسخ می-دهند. هر سیگنال، هر نوع عامل خارجی از جمله عوامل شیمیایی و فیزیکی که از طریق سلول گیاهی دریافت و یا احساس شود و نهایتا یک پاسخ را بوجود آورد گفته می‌شود.

---

۱ - Osmotic adjustment
۲ - Signal

۱-۵ مکان‌های ژنی کنترل کننده‌ی صفات کمی[۱] (QTL)

صفاتی که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و عوامل محیطی نقش مهمی در تظاهر آنها دارند تحت عنوان صفات کمی گروه‌بندی می‌شوند. Mather اصطلاح پلی‌ژن[۲] را برای ژن‌های کنترل کننده صفات کمی ارائه کرد [۶۲]. براساس این نظریه صفات کمی توسط تعداد زیادی ژن با اثرات افزایشی کوچک و یکسان کنترل می‌شوند و سهم تک تک ژن‌ها در تغییرات فنوتیپی صفت کمتر از اثر عوامل محیطی بوده و قابل تشخیص نمی‌باشد. امروزه مفهوم QTL یعنی مکان‌های کنترل کننده‌ی صفات کمی جایگزین مفهوم پلی‌ژن شده است. QTL در واقع به ناحیه کروموزومی کنترل کننده‌ی صفات کمی اطلاق می‌شود که ممکن است شامل یک ژن بزرگ اثر یا گروهی از ژن‌ها با پیوستگی ضعیف یا قوی باشد. بر خلاف نظریه پلی‌ژنتیک، QTL می‌تواند کوچک اثر[۳] یا بزرگ اثر[۴] بوده و امکان برآورد سهم اثر QTL در تغییرات فنوتیپی کل صفت وجود دارد [۹۴].

اخیرا پیشرفت‌های تحسین برانگیزی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و فناوری زیستی صورت گرفته که ابزار مناسبی برای مطالعه جزئیات ژنتیکی گیاهان زراعی فراهم آورده است. یکی از پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه ژنتیک مولکولی فرآیندهای نشاندار کردن و مکان‌یابی ژن‌هاست.

انجام فرآیندهای فوق در صفات کمی[۵] به دلیل کنترل ژنتیکی پیچیده آن‌ها نسبت به صفات کیفی[۶] مشکل‌تر و نیازمند روش‌های ژنتیکی و روش‌های آماری پیچیده‌تری می‌باشد. یکی از مهم‌ترین روش‌های مطالعه‌ی خصوصیات ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، روش مکان‌یابی QTL[۷] می‌باشد که عبارت است از مطالعه تفرق همزمان آلل‌های نشانگر ژنتیکی و ارزش فنوتیپی افراد که در نتیجه این تجزیه‌ی همزمان، شناسایی و مکان‌یابی QTL امکان‌پذیر می‌گردد.

تصورات اولیه شناسایی QTL بیش از ۸۰ سال قبل آغاز شد [۷۹]. ولی در سال‌های اخیر دستیابی به نشانگرهای مولکولی[۸] و روش‌های بیومتری قوی باعث پیشرفت‌های قابل توجهی در این زمینه شده است. تجزیه QTL[۹] باعث یافتن مکان‌هایی از ژنوم می‌شود که اثر معنی‌داری بر صفت کمی دارند. با شناسایی این محل‌ها می‌توان برنامه‌های اصلاحی را تسریع و زمینه بهبود ژنتیکی را فراهم کرد [۸].

مکان‌های ژنی صفات کمی را می‌توان براساس خصوصیات زیر شناسایی کرد [۸۸]

---

۱ - Quantitative trait loci
۲ - Polygene
۳ - Minor
۴ - Major
۵ - Quantitative traits
۶ - Qualitative traits
۷ - Mapping QTL
۸ - Molecular markers
۹ - Analysis QTL

- هر QTL به تنهایی از الگوی تفرق مندلی[۱] پیروی می‌کند.

- ژن‌های زیادی در کنترل یک صفت کمی دخالت دارند.

- ژن‌های هر ناحیه QTL کوچک اثرند.

- فنوتیپ تحت کنترل QTL تا اندازه زیادی تحت تاثیر محیط قرار دارد.

- ژن‌های دخیل می‌توانند به صورت بارز[۲] یا هم‌بارز[۳] باشند.

- ژنوتیپ‌های مختلف زیادی می‌توانند فنوتیپ مشابه‌ی تولید کنند.

- ژن‌های ناحیه QTL می‌توانند دارای اپیستازی[۴] نیز باشند.

روش‌های مختلف برای مکان‌یابی QTL وجود دارد که دقت هر روش فقط وابسته به روش آماری آن جهت شناسایی QTL و برآورد اثر ژنتیکی آن نبوده بلکه فاکتورهای دیگری هم از جمله نوع جمعیت در حال تفرق، میزان توارث‌پذیری[۵] صفت مورد مطالعه، تعداد و نقش هر یک از QTLها در ژنوم، تعداد نشانگرها و نوع آن‌ها در نقشه پیوستگی، روش ارزیابی صفات و . . . در میزان این دقت موثر می‌باشند [۱۵].

شناسایی QTLها به چهار عامل مهم بستگی دارد [۵۰]

- اندازه پیوستگی[۶] ژنتیکی بین QTL و نشانگر،

- مقدار اثر یک QTL،

- بزرگی جمعیت نقشه‌یابی و

- میزان توارث‌پذیری صفت مورد نظر.

هدف از نقشه‌یابی QTL، عبارت از یافتن پیوستگی بین مکان ژنی (آلل) یک نشانگر و مکان ژنی کنترل کننده یک صفت کمی می‌باشد. مکان ژنی صفت کمی ممکن است از چندین ژن پیوسته و نزدیک به هم یا گروهی از ژن‌های شرکت کننده در بیان صفت تشکیل شده باشد. تعیین تعداد، محل و اثرات متقابل مکان‌های ژنی سهیم در تغییرات فنوتیپی، هدف ماقبل آخر نقشه‌یابی QTL است. در حالی که هدف نهایی را می‌توان شناسایی و جداسازی ژن‌های واقعی درگیر در بیان صفت دانست [۵۰].

---

۱ - Mendelian segregation
۲ - Dominant
۳ - Co-Dominant
۴ - Epistasis
۵ - Herittability
۶ - Linkage

۱-۶ اصول مکان‌یابی QTL

مکان‌یابی QTL براساس جستجوی منظم و سیستمی برای عدم تعادل پیوستگی بین لوکس نشانگر و QTLهاست [۱]. یک QTL می‌تواند از چندین ژن که به هم پیوسته هستند و یک گروه از ژن‌ها که در بیان صفت دخالت دارند تشکیل شده باشد [۵۰].

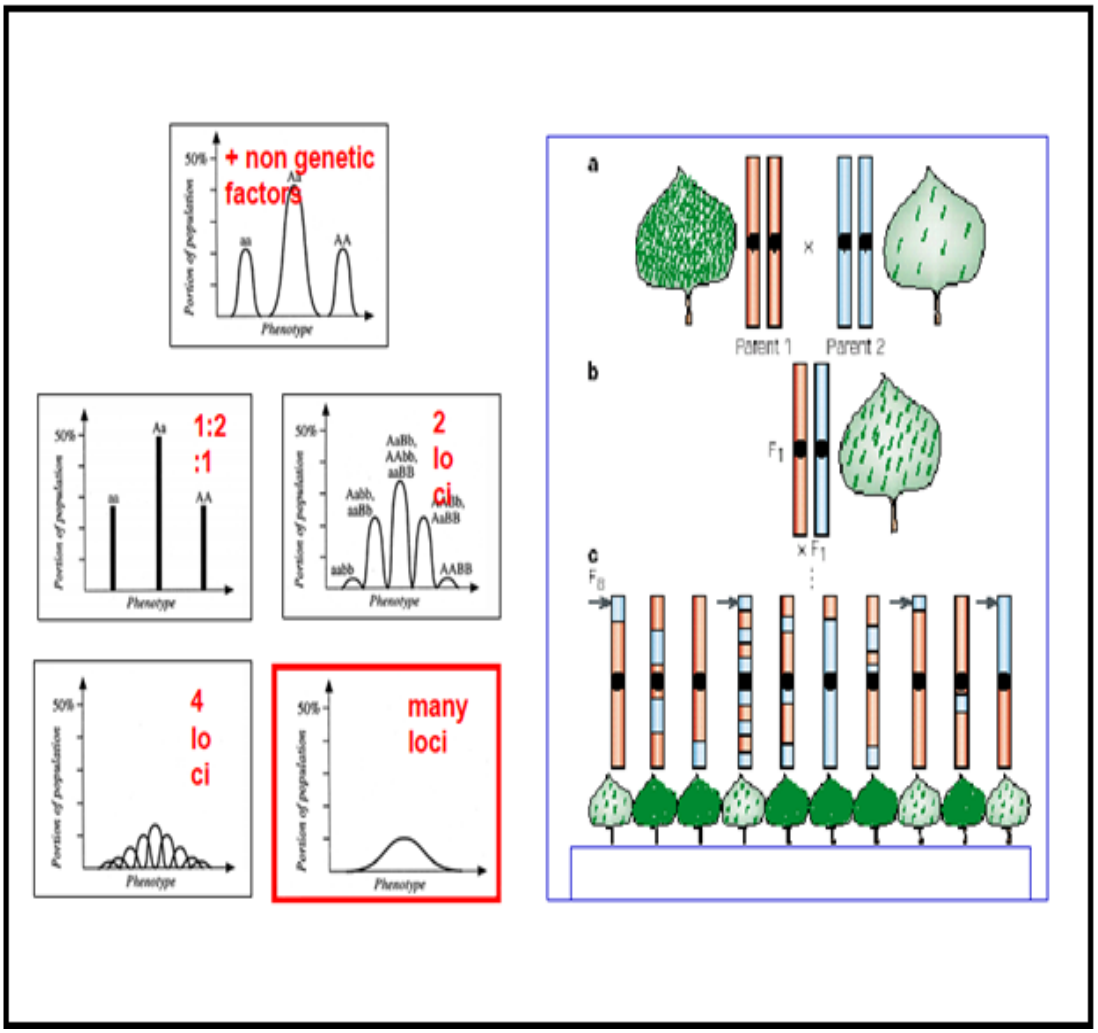
نقشه‌یابی QTL شامل چند مراحل اساسی است (۱-۲). تهیه جمعیت نقشه‌یابی جزء ضروری‌ترین این مراحل به شمار می‌رود. این جمعیت معمولا از تلاقی بین دو ژنوتیپ والدینی که از نظر آلل‌های موثر بر تنوع صفت با یکدیگر تفاوت دارند ایجاد می‌شود (شکل۱-۱). یک نقشه پیوستگی مبتنی بر نشانگر مولکولی این امکان را فراهم می‌کند که آلل‌های مربوط به هر والد در جمعیت قابل تمایز و تشخیص باشند. هر چقدر تعداد نشانگر در این نقشه زیادتر باشد وضوح و دقت نقشه‌یابی بالاتر خواهد بود. آلل‌های والدینی در جمعیت نقشه‌یابی با هم آمیخته می‌شوند به طوری که فنوتیپ‌های هر فرد قابل ارزیابی و اندازه‌گیری خواهند بود. در نهایت با استفاده از روش‌های آماری، نقشه‌یابی QTL امکان تعیین نواحی از کروموزوم که ممکن است دارای ژن‌های مؤثر در تنوع فنوتیپی باشند فراهم می‌کند [۶۳].

۱-۶-۱ جمعیت‌های در حال تفکیک

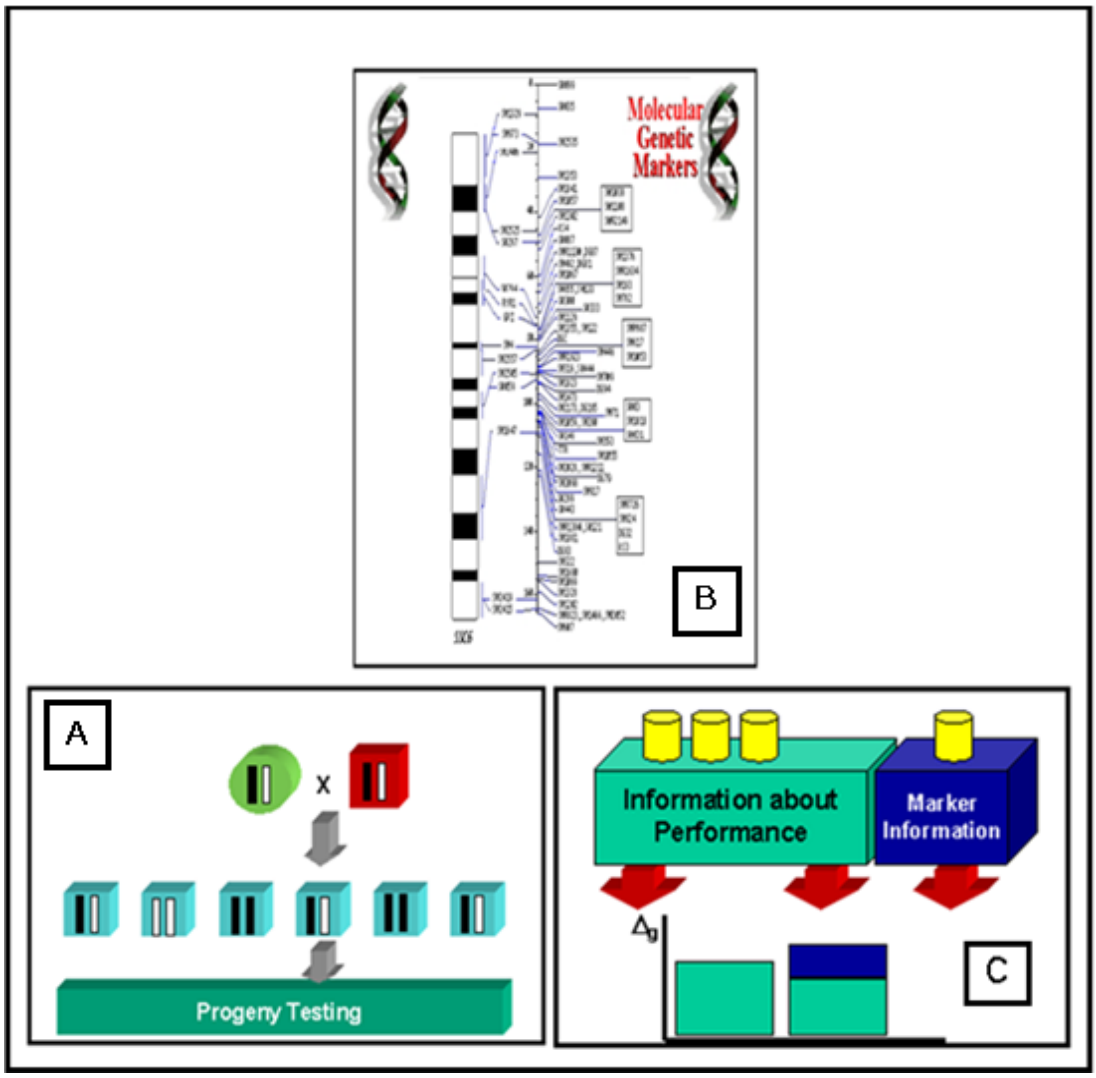
اولین و مهم‌ترین مرحله در مکان‌یابی QTL تهیه جمعیت نقشه‌یابی برای بررسی‌های ژنتیکی و فنوتیپی است. براساس اندازه تنوع و هموزیگوسیتی مورد انتظار در یک جمعیت و نحوه تولید مثل گیاه، جمعیت‌های نقشه‌یابی که برای گیاهان خودگشن مثل گندم به کار می‌روند عبارتند از: جمعیت F۲، جمعیت حاصل از تلاقی برگشتی[۱](BC)، هاپلوئیدهای مضاعف[۲](DHs) و لاین‌های اینبرد نوترکیب (RILs)[۳].

---

۱ - Backcross
۲ - Doubled haploid
۳ - Recombinant inbred lines



شکل ۱-۱ انتخاب والدین و توسعه جمعیت نقشه‌یابی.



شکل ۱-۲ شمایی از اصول مکان‌یابی QTL. A: جمعیت نقشه‌یابی B: نقشه پیوستگی ژنتیکی C: روش‌های آماری قوی.

۱-۶-۱-۱ جمعیت در حال تفکیک F_2

ساده‌ترین شکل یک جمعیت نقشه‌یابی، مجموعه‌ای از گیاهان F_2 می‌باشد. این نوع جمعیت از طریق خودگشنی افراد F_1 حاصل می‌شود. در این جمعیت در صورت امکان، ژنوتیپ‌های والدینی باید در همه صفات مورد مطالعه متفاوت باشند. درجه چندشکلی[۱] می‌تواند در سطح فنوتیپی و با استفاده از نشانگرهای مولکولی ارزیابی شود. از دیدگاه ژنتیکی معمولا یک جمعیت F_2، محصول در هم آمیختن مواد ژنتیکی یا همان ژنوتیپ‌های والدینی در جریان میوز می‌باشد. در جمعیت F_2 هر فرد برای هر یک از جفت کروموزوم‌های همولوگ نوترکیب است. اما مانند یک جمعیت بک‌کراس فقط یک سیکل میوزی را طی کرده است. بنابراین یک فرد F_2 حاوی دو برابر میزان اطلاعاتی است که یک فرد جمعیت تلاقی برگشتی دارد و همچنین به علت اینکه یک جمعیت F_2 دارای کلیه ترکیبات آللی والدینی می‌باشد، توانایی شناسایی و برآورد اثر غالبیت را

---

[۱] - Polymorphism

دارد و از یک نشانگر هم‌بارز حداکثر اطلاعات از جمعیت F_2 به دست می‌آید. یکی از اشکالات بزرگ جمعیت F_2 این است که در مورد نشانگرهای غالب مثل RAPD[1] و AFLP[2] تمایز بین مکان‌های ژنی خالص غالب و مکان‌های ژنی ناخالص غیرممکن است. مشکل اصلی جمعیت F_2 این است که جمعیت پایداری نیست و به شدت تحت تاثیر تغییرات محیطی است و تفرق زیادی نشان می‌دهند، برخلاف هاپلوئیدهای مضاعف و لاین‌های اینبرد نوترکیب قابل تکرار و نگهداری نمی‌باشد.

۱-۶-۱-۲ جمعیت حاصل از تلاقی‌برگشتی (BC)

یک جمعیت تلاقی برگشتی از آمیزش ژنتیکی بین هیبرید F_1 و یکی از ژنوتیپ‌های والدین حاصل می‌شود. در طی این پروسه، بخش‌های کوچکی از ژنوم والد دهنده تفکیک و در زمینه‌ای از ژنوم والد دوره‌ای به صورت تصادفی توزیع و جداسازی می‌شوند. به منظور کاهش بیشتر تعداد و اندازه قطعات دهنده، تلاقی برگشتی تکرار می‌شود به طوری که با هر دور بک-کراس، سهم ژنوم والد دهنده به اندازه ٪ ۵۰ کاهش می‌یابد.

مهم‌ترین مانع در استفاده از جمعیت‌های تلاقی‌برگشتی و F_2 عدم پایداری آن‌هاست. در هر جمعیت تلاقی برگشتی تنها دو ژنوتیپ وجود دارد، از این رو اگر به هر سه نوع ژنوتیپ نیاز باشد باید هر دو نوع جمعیت تلاقی‌برگشتی (تلاقی با هر دو والد) تهیه شود. همچنین میزان اطلاع‌دهی جمعیت حاصل از تلاقی‌برگشتی کمتر از جمعیت F_2 است. یک اشکال مشترک این دو جمعیت، سطح پایین هموزیگوسیتی آن‌ها در مقایسه با جمعیت‌های RIL و DH می‌باشد. راه حل این مشکل، روشی به نام آنالیز QTL در نسل‌های پیشرفته تلاقی‌برگشتی[3] می‌باشد که توسط Nelson و Tanksley در ۱۹۹۶ پیشنهاد شد در این روش آنالیز تفکیک نشانگر و فنوتیپ به صورت همزمان در یک جمعیت پیشرفته از تلاقی‌برگشتی انجام می‌شود [۶۸ و ۸۸]. به عبارت دیگر در این روش آنالیز QTL تا زمانی که نسل بک‌کراس پیشرفته مثل BC_2 و BC_3 تولید شوند، به تاخیر می‌افتد. ردیابی QTL روی قطعات کوچک والد دهنده مستقر در بستر ژنوم والد دوره‌ای متمرکز خواهد شد.

در مقایسه با جمعیت‌های RIL و DH، یک جمعیت تلاقی برگشتی پیشرفته ممکن است نقشه‌هایی با وضوح بیشتر از QTL به ما بدهد زیرا فقط قطعات کوچکی از والد دهنده در ژنوم والد دوره‌ای جمع می‌شوند. با وجود این به علت کاهش سهم ژنوم و میزان تنوع ژنتیکی والد دهنده در نسل‌های پیشرفته، توان شناسایی و تشخیص QTL در جمعیت BC پایین‌تر می‌باشد بنابراین به منظور بهبود ردیابی QTLها، یک جمعیت تلاقی‌برگشتی پیشرفته باید بزرگتر از جمعیت‌های RIL و DH باشد.

---

[1] - Random amplified polymorphic DNA
[2] - Amplified fragment length polymorphism
[3] - Advanced backcross

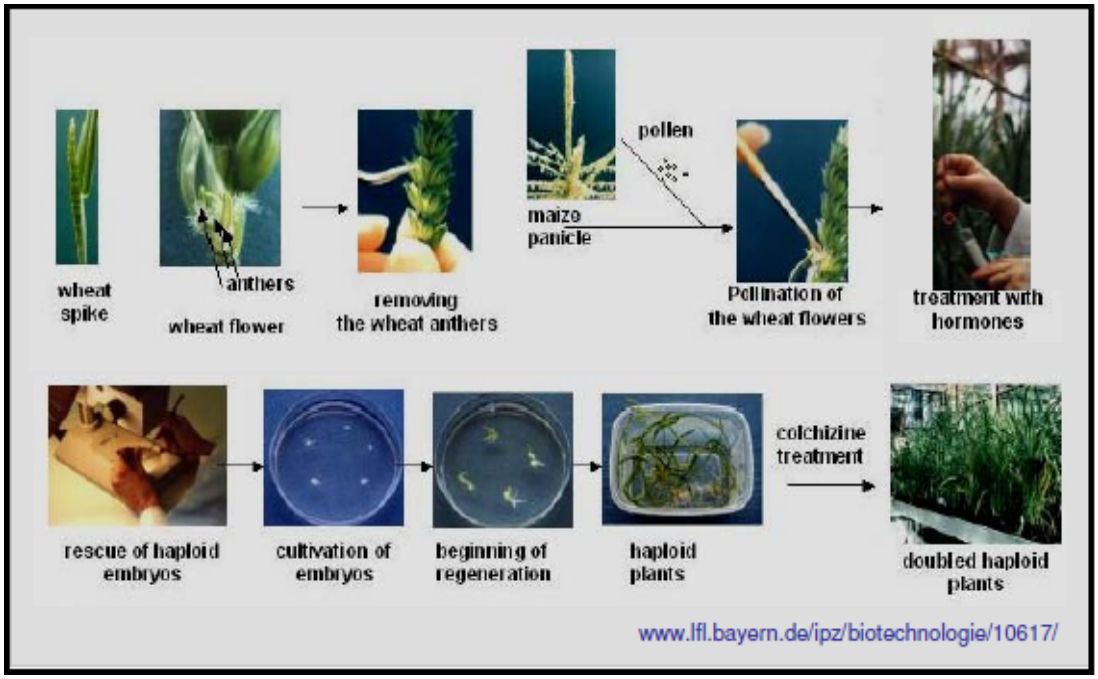
۱-۶-۱-۳ جمعیت هاپلوئید مضاعف (DH)

هاپلوئیدهای مضاعف کاملا خالص را از راه تلاقی بین گونه‌ای و نجات جنین هاپلوئیدی و یا از طریق کشت پرچم و مضاعف کردن تعداد کروموزوم‌ها می‌توان بدست آورد. دو روش متداول برای تولید این جمعیت‌ها در گندم نان عبارتند از کشت میکروسپور[۱] [۹۹] و سیستم تلاقی گندم- ذرت [۸۶]. در روش دوم اگر چه گندم و ذرت به زیرخانواده‌های متفاوتی از گرامینه تعلق دارند، باروری سلول تخم گندم با گرده ذرت به طور موفقیت‌آمیزی انجام می‌گیرد (شکل ۱-۳). بعد از حذف طبیعی کروموزوم‌های ذرت، باروری سلول‌های تخم منجر به ایجاد جنین‌های هاپلوئید می‌شود. به دلیل اینکه گیاهان حاصل دارای جفت کروموزوم‌های کاملا همولوگ می‌باشند میزان تنوع حاصل از نوترکیبی دقیقا برابر یک جمعیت بک‌کراس است.

در کنار هموزیگوسیتی کامل، چیزی که می‌تواند در جمعیت دابل‌هاپلوئید برای دقت بیشتر نقشه‌یابی QTL سودمند باشد، فراهم آمدن یک ساختمان ژنتیکی پایدار از نظر سطح نوترکیبی در این جمعیت می‌باشد در این لاین‌ها افراد صد در صد خالص هستند. و مزیت هاپلوئیدهای مضاعف نسبت به لاین‌های اینبرد نوترکیب این است که در زمان کمتری قابل تهیه‌اند. البته ممکن است در طی مضاعف کردن کروموزوم‌ها، اختلالاتی در برخی از افراد حاصل ایجاد شود که این یکی از معایب این جمعیت است.

در کنار هموزیگوسیتی کامل، چیزی که می‌تواند در جمعیت دابل‌هاپلوئید برای دقت بیشتر نقشه‌یابی QTL سودمند باشد، فراهم آمدن یک ساختمان ژنتیکی پایدار از نظر سطح نوترکیبی در این جمعیت می‌باشد در این لاین‌ها افراد صد در صد خالص هستند. و مزیت هاپلوئیدهای مضاعف نسبت به لاین‌های اینبرد نوترکیب این است که در زمان کمتری قابل تهیه‌اند. البته ممکن است در طی مضاعف کردن کروموزوم‌ها، اختلالاتی در برخی از افراد حاصل ایجاد شود که این یکی از معایب این جمعیت است

[۱] - Microspore culture



شکل ۱-۳ سیستم تلاقی گندم و ذرت و تولید دابل‌هاپلوئید

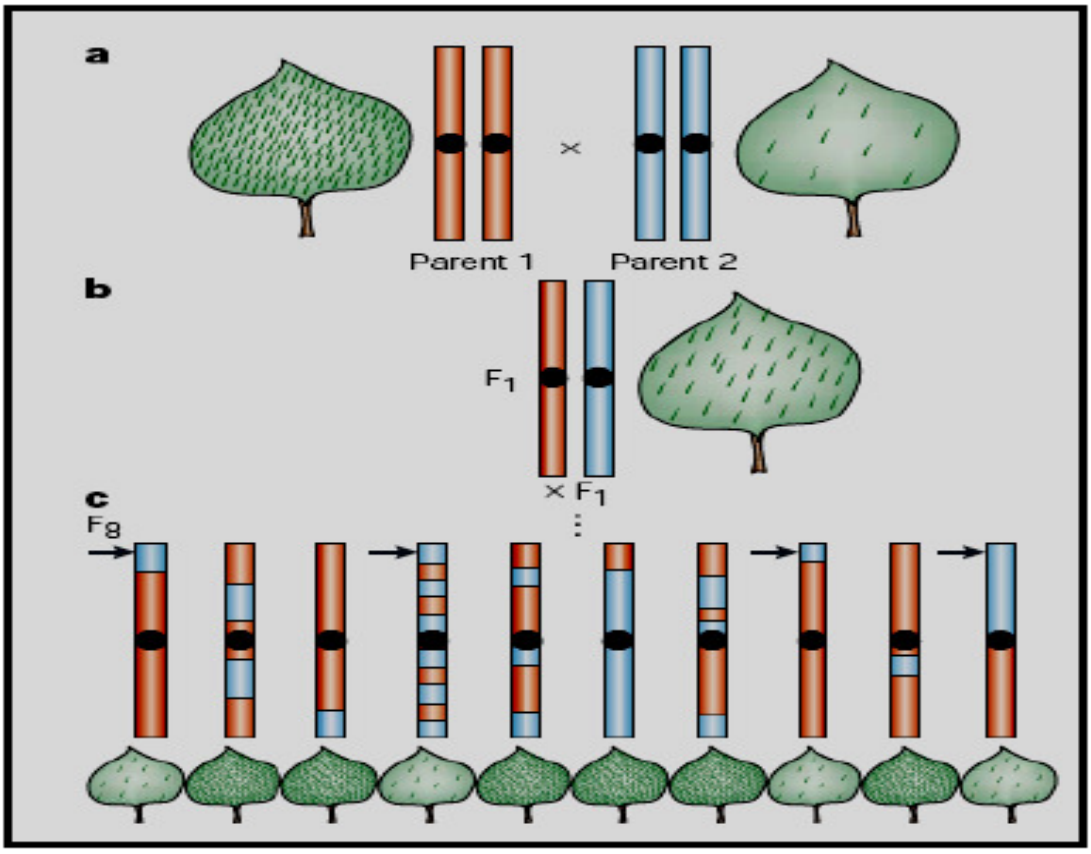
۱-۶-۱-۴ جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب (RILs)

لاین‌های اینبرد نوترکیب (RILs) نتاج هموزیگوت افرادی از یک جمعیت F_2 هستند که پشت سرهم و در طی چند نسل خوگشن شده اند (شکل ۱-۴). به علت اینکه در فرآیند خودگشنی، تنها یک بذر از هر لاین، منشأ نسل بعدی است، بنابراین به RILها، لاین‌های نتاج تک بذر یا SSD[۱] نیز گفته می‌شود. بطور تئوریکی در طی شش یا هفت نسل تکثیر به این روش، می‌توان به درجه بالایی از خلوص ژنتیکی (حدود ۱/۶٪ هتروزیگوسیتی) دست یافت و در نهایت لاین‌هایی با سطح نوترکیبی ثابت و منبع ژنتیکی دائمی حاصل می‌شوند. به دلیل آنکه نوترکیبی نمی‌تواند تغییرات زیادی در ساختمان ژنتیکی RILها ایجاد کند، آن‌ها تفرق کمتری را طی نسل‌های متوالی خواهند داشت. بنابراین به‌عنوان یک مزیت بزرگ، چنین جمعیتی منبع ژنتیکی پایداری را فراهم می‌کند که می‌تواند به صورت نامحدودی تکثیر و توسط گروه‌های زیادی از پژوهش‌گران و گروه‌های پژوهشی برای مقاصد تقشه‌یابی ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. مزیت دیگر جمعیت‌های RIL این است که به دلیل وقوع چندین باره میوز تا پیش از رسیدن جمعیت به درجه بالای خلوص ژنتیکی، سطح نوترکیبی در مقایسه با جمعیت F۲ و هاپلوئیدهای مضاعف بالاتر است که این به نوبه خود احتمال یافتن QTL را افزایش خواهد داد. بطور کلی نقشه‌های حاصل از جمعیت‌های RIL، دقت بالاتری نسبت به جمعیت F۲ دارند به طوری که حتی موقعیت نشانگرهای خیلی نزدیک به هم در نقشه ژنتیکی می‌تواند قابل تشخیص باشد [۱۳]. زمانی که از هاپلوئید مضاعف یا لاین‌های اینبرد نوترکیب برای تهیه نقشه ژنتیکی استفاده شود ،مقدار اطلاعات ژنتیکی حاصل از نشانگرهای غالب برابر با نشانگرهای هم‌بارز

---

[۱] - Singel seed descent

خواهد بود. به خاطر مزیت جمعیت هاپلوئیدهای مضاعف و لاین‌های اینبرد نوترکیب نسبت به جمعیت تلاقی‌برگشتی می-توان از تعداد کمتری افراد نسبت به جمعیت تلاقی‌برگشتی استفاده کرد. علاوه بر این برآوردهای دقیق‌تری از مکان QTL بدست می‌آید [۵].



شکل ۱-۴ شمایی از ساختار لاین‌های اینبرد نوترکیب.

۱-۶-۲ نشانگرها مولکولی و نقشه ی پیوستگی[۱]

یکی از مراحل مهم دیگر در مکان‌یابی QTL تهیه‌ی نقشه‌ی پیوستگی است. این نقشه براساس نشانگرهایی که بین دو والد سازنده‌ی جمعیت در حال تفکیک چندشکلی[۲] نشان داده‌اند، تهیه می‌شود. هر چه این نقشه اشباع و حامل نشانگرهای بیشتری باشد وضوح تعیین محل QTLها بیشتر است. این کار در طی پروسه ارزیابی ژنتیکی[۳] انجام می‌گیرد. در این پروسه تفکیک و تفرق آلل‌ها در جمعیت به کمک نشانگرهای مولکولی ارزیابی می‌شود. داده‌های حاصل می‌توانند در تشخیص

۱ - Linkage map
۲ - Polymorphism
۳ - Genotyping