مقدمه

یک ژن را می‌توان به صورت قطعه‌ای از یک مولکول DNA و حاوی رمز برای توالی اسید آمینه‌ای یک رشته پلی پپتیدی و توالیهای تنظیم کننده لازم برای بروز آن در نظر گرفت. در بین جانداران دو نوع سلول یوکاریوت و پروکاریوت در نظر گرفته می‌شود. جانداران یوکاریوت به جاندارنی گفته می‌شود که سلولهای آنها دارای هسته است و مولکولهای DNA آنها در داخل ساختمانهایی به نام کروموزوم درهسته بسته بندی شده‌اند. یکی از اجزای کلیدی و زیر بنایی مورد نیاز در برنامه های به‌نژادی گیاهان وجود نقشه‌های ژنتیک می‌باشد. بر اساس نحوه آرایش ژن‌ها روی کروموزوم‌ها و ماهیت اندازه‌گیری فواصل ژنی تعاریف مختلفی از نقشه ژنتیکی توسط دانشمندان ارائه شده است.

انواع نقشه‌ها

مکان یابی و نشانمند کردن ژن های کنترل کننده صفات مختلف نیازمند استفاده از جایگاههایی است که دارای توارث مندلی بوده و کمتر تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می گیرند و به آسانی قابل ارزیابی باشند. این دیدگاه منجر به تهیه نقشه های ژنتیکی در گیاهان مختلف گردید. به طور کلی نقشه ها را می توان به چهار گروه عمده تقسیم کرد:

الف) نقشه‌های سیتوژنتیکی[۱]

ب) نقشه‌های فیزیکی[۲]

ج) نقشه‌های توالی نوکلئوتیدی[۳]

د)نقشه‌های پیوستگی (لینکاژ)[۴]

۱- Cytogenetic maps

۲- Physical maps

۳- Nucleotide sequence maps

٤- Linkage maps

الف) نقشه‌های سیتوژنتیکی

اگر تمامی کروموزومهای یک ژنوم از نظر الگو و اندازه نوارها ،نسبت بازوها و یا دیگر مشخصات سیتولوژیکی قابل تشخیص باشند،آنگاه می‌توان جایگاه ژن‌های کنترل کننده صفت مورد نظر را به کروموزوم خاص نسبت داد. برای تهیه نقشه های سیتو ژنتیکی از روشهای مختلف استفاده می شود.

۱- تکنیک FISH [۱]

این تکنیک اجازه ایجاد نقشه قسمتی از DNA با مکان ناشناخته روی کروموزوم را فرهم می‌نماید. معمولاً از کاوشگرهای[۲] نشاندار رادیو اکتیو یا فلورسانت در این روش استفاده می‌شود.

۲- رنگ‌آمیزی کروموزوم[۳]

در این روش از یکسری قطعات DNA که مختص مکان خاص کروموزومی بوده و هر کدام توسط یک رنگ فلورسنتی نشان دار شده‌اند، استفاده می‌شود. رنگ‌های مختلف فلورسانت در طول موجهای مختلف قرار دارند، بنابراین جهت آشکار کردن نوترتیبی‌های کروموزومی مناسب هستند.

۳- نوترتیبی نقاط شکستگی[۴]

روشی است که به کمک آن می‌توان محل شکستگیهای DNA را در نوترتیبی‌های کروموزومی مشخص کرد، که در این روش هم از تکنیک FISH و هم از ساترن بلاتینگ[۵] با کاوشگرهایی که با نقاط شکسته همپوشانی دارند، استفاده می‌شود.

۵- Flourescent *In Situ* Hybridization

٦- Probes

۱- Chromosome painting

۲- Rearrangment breakpoint mapping

۳- Southern blotting

٤- هیبریداسیون سلول بدنی[١]

در این روش ابتدا قطعات DNA از سلول‌های پرتوتابی شده به کمک پلی اتیلن گلیکول (PEG) [٢] به ژنوم سلول‌های گیرنده می‌پیوندد. سلولهایی که DNAی دهنده وارد آنها شده است با استفاده از محیط کشت انتخابی گزینش می‌شوند. سپس همسانه‌های چند سلولی جداسازی شده و لاین‌های سلولی از آنها حاصل می‌شوند. مجموعه این همسانه‌ها یک هیبرید پانل[٣] نامیده می‌شود و سپس برای تعیین هم انتقالی[۴] آزمایش می‌شوند. آن نشانگرهائی که بطور فراوان با هم در یک لاین سلولی به وقوع پیوندند دارای لینکاژ یا پیوستگی بالایی با یکدیگر هستند. واحد فاصله این نقشه براساس سانتی‌ری[۵] که برابر با فاصله دو نشانگر مطابق با ۱ درصد فراوانی شکستگی DNA بعد از تابش سلولهای دهنده می‌باشد.

این روش(هیبریداسیون سلولهای بدنی) دارای محاسن و معایبی است:

- دارای کیفیت تجزیه و تحلیل بالاتر نسبت به نقشه‌های پیوستگی (حتی تا حدود ۱۰ برابر)
- براساس نشانگرهای چند شکل نیست (برخلاف نقشه‌های پیوستگی)
- می‌تواند معایب قسمتهایی از ژنوم که نقشه‌های میوزی قادر به کار کردن در آن قسمتها نیستند را حل کند که این قسمتها را اصطلاحاً لکه‌های سرد[۶] می‌نامند.
- در مورد موجوداتی که مباحث اخلاقی در آنها مطرح است مثل انسان قابل استفاده است.
- عیب اصلی این روش حساسیت ژنوم به اشعه X می باشد.

---

٤ - Radiation Hybrid mapping

٥ - Polyethylen glycol

٦ - Hybrid panel

٧ - Co-transfer

١ - Centi-Ray

٢ - Cool spots

ب) نقشه‌های فیزیکی

نقشه‌های فیزیکی نقشه‌هایی هستند که از قطعات همسانه‌سازی شده DNA در کتابخانهٔ همسانه‌ها[۱] حاصل می‌شوند. مکان همسانه‌ها در ارتباط با یکدیگر و روی یک کروموزوم خاص مشخص می‌شوند.

نقشه‌یابی فیزیکی در چهار مرحله صورت می‌پذیرد:

۱- تولید یک کتابخانه ژنومی

۲- مشخص کردن توالی DNA در همسانه یا حداقل انتهای چپ یا انتهای راست هر همسانه

۳- مقایسه انتهاهای چپ و راست هر همسانه برای همپوشان[۲] کردن آنها

۴- تبدیل همسانه‌های همپوشان به یک کانتیگ[۱]

هدف نهایی ایجاد نقشه‌ای است که دارای تعداد زیادی کانتیگ روی کروموزوم‌ها است که کل ژنوم را پوشش دهد. هرچه همسانه‌های بیشتری استفاده شوند کانتیگ‌ها طویل‌تر شده و در یکدیگر فرو می‌روند و در نهایت تعداد کانتیگ‌ها با تعداد کروموزوم‌ها برابر می‌شوند.

ج) نقشه‌های توالی نوکلئوتیدی

در این روش از دو راهبرد مختلف جهت توالی‌یابی ژنوم بهره گرفته می‌شود:

۱- توالی‌یابی همسانه‌های مرتب شده

۲- توالی‌یابی کل ژنوم

د) نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی

نقشه پیوستگی موقعیت نسبی نشانگرهای ژنتیکی خاص را در طول کروموزوم‌ها نشان می‌دهد. اصول ایجاد نقشه‌های پیوستگی براساس وقایع نوترکیبی که در میوز به وقوع می‌پیوندند استوار است.

۳- Clones

٤- Overlapping

۱- Contig

اصول تهیه نقشه ژنتیکی

پیوستگی را می‌توان به صورت تمایل آللهای نزدیک هم ، روی یک کروموزوم در انتقال با یکدیگر به صورت یک واحد دست نخورده در طی میوز تعریف کرد. تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی، شیوه‌ای از نقشه برداری ژنهاست که از مطالعات روی خانواده‌ها برای تعیین پیوستگی دو ژن هنگام انتقال از یک نسل به نسل بعدی استفاده می‌کند.

دو ژن را زمانی پیوسته می‌نامند که روی یک کروموزوم مجاور هم و در یک فاصله کمتر از فاصله‌ای که امکان نو ترکیبی صد در صد وجود داشته باشد, قرار داشته باشند. کروموزوم‌های مختلف در طی تقسیم میوز به صورت مستقل تفکیک می‌شوند، بنابراین برای دو ژن که روی کروموزم‌های مختلف قرار داشته باشند آلل‌های آنها به صورت مستقل تفکیک می‌یابند. شانس اینکه یک آلل در یک مکان ژنی به همراه آلل دیگر با منشاء یکسان والدی با هم به ارث برسند برابر ۰/۵ می‌باشد و چنین ژن‌هایی را ناپیوسته[1] می‌نامند. برای مثال:

والد ۲	AA BB × aa bb	والد ۱
(۱۰۰٪)	Aa Bb	نسل ۱ (F_1)
ab	AB Ab aB	گامت‌های F_1
۲۵	۲۵ ۲۵ ۲۵	A و B ناپیوسته هستند
۳۵	۳۵ ۱۵ ۱۵	A و B پیوسته هستند
۴۸	۴۸ ۲ ۲	A و B بسیار پیوسته هستند

شانس اینکه A/B یا a/b با هم به ارث برسند، زمانی که به صورت ناپیوسته هستند برابر ۰/۵ است، ولی این شانس موقعی که به صورت پیوسته باشند افزایش می‌یابد و می‌توان درجه‌ای از پیوستگی را مشاهده نمود. این وقایع می‌تواند به دلیل نوترکیبی[2] در فرآیند تقسیم میوز باشد. در این فرآیند کروموزوم ها می‌شکنند و نواحی با کروموزوم همولوگ[3] می‌توانند ترکیبات جدید کروموزومی را ایجاد کنند، که به این پدیده کراسینگ‌آور[4] گفته می‌شود.

---

۱ - Unlinked

۲ - Recombination

۳ - Homologue

٤ - Crossover

با استفاده از روش تست کراس[۱] می‌توان پدیده پیوستگی را مورد بررسی قرار داد، که این عمل از طریق تلاقی گیاهان F_1 با والد هموزیگوت مغلوب امکان‌پذیر است و بر این اساس نوترکیبی محاسبه می‌شود:

$$r = \frac{\text{تعداد نتاج نوترکیب}}{\text{تعداد کل نتاج}}$$

براساس اینکه فاز پیوستگی ژنها یا نشانگرها در والدین به صورت جفت[۶] یا نا جفت[۷] باشد, نوترکیب‌ها متفاوت خواهند بود.

تعادل پیوستگی[۲] و عدم تعادل پیوستگی[۳]

به هم خوردن تعادل در پیوستگی واژه‌ای است که به شانس باهم به ارث رسیدن آلل‌ها در مکان‌های ژنی مختلف اطلاق می‌گردد. اگر فراوانی گامت‌ها به ترتیب زیر باشد تعادل پیوستگی وجود دارد:

فراوانی (AB) = فراوانی (Ab) = فراوانی (aB) = فراوانی (ab)

میزان عدم تعادل پیوستگی به صورت زیر محاسبه می‌شود:

D = [فراوانیِ (AB) × فراوانی (ab)] ـ [فراوانی (Ab) × فراوانی (aB)]

عدم تعادل پیوستگی می تواند از عوامل دیگر نیز ناشی شود. اولین عامل انتخاب[۴] می‌باشد که به آن، اثر بولمر[۵] گویند که کاهش تنوع در اثر انتخاب را بیان می‌کند، عامل دوم در اثر مهاجرت[۶] یا تلاقی اتفاق می‌افتد که فراوانی یکسری گامت‌ها را در جمعیت افزایش می دهد. به هر حال بعد از چندین نسل فراوانی گامت‌ها به هم نزدیک خواهند شد که حاکی از وجود تعادل است. هرچه پیوستگی بیشتر باشد این فرآیند

۵- Test cross

٦- Coupling

۷- Repulsion

۱- Linkage equilibrium

۲- Linkage disequilibrium

۳- Selection

٤-Bulmer effect

۵- Migration

زمان بیشتری طول خواهد کشید. اگر فاصله بین دو ژن کمتر از یک سانتی مورگان[۱] باشد، ژنها وارد تعادل خواهند شد (البته اگر انتخابی در کار نباشد) . عامل سوم جهش‌های جدید[۲] ایجاد شده در ژنوم می‌باشد که می‌تواند روی تعادل پیوستگی تاثیر گذار باشد.

توابع نقشه‌یابی[۳]

فاصله بین دو ژن توسط اجزاء نوترکیبی[۴] مشخص می‌شود. واحد نقشه پیوستگی براساس سانتی مورگان[۵] می‌باشد. یک سانتی مورگان فاصله‌ای است که در آن به طور متوسط یک کراسینگ‌آور در هر میوز اتفاق می‌افتد. توزیع احتمال وقوع کراسینگ‌آور در طول ژنوم یکسان نیست و در قسمت‌های یوکروماتین[۶] احتمال تشکیل کیاسما[۷] بیشتر است. در قسمتهای هتروکروماتین[۸] مثل نواحی تلومر[۹] و سانترومر[۱۰] احتمال تشکیل کیاسما کمتر است. اگر نقشه‌های پیوستگی را با نقشه‌های فیزیکی[۱۱] مقایسه کنیم، در نقشه‌های فیزیکی فاصله ژن‌ها برحسب تعداد نوکلئوتید است، بنابراین فاصله ژن‌ها در قسمت های یوکروماتین و هتروکروماتین تابع شرایط آن قسمت ژنوم نبوده و بر حسب نوکلئوتید محاسبه می‌شود. بنابراین در موجوداتی که نقشه‌های پیوستگی و فیزیکی کامل وجود دارد، تفاوت‌هایی در قسمت‌های هتروکروماتین بین این دو نقشه وجود دارد.

٦- Centimorgan

٧- New mutations

١- Mapping functions

٢- Recombination fractions

٣- Morgan

٤- Euchromation

٥- Chiasma

٦- Heterochromatin

٧- Telomere

٨- Centromere

٩- Physical maps

اگرچه فواصل ژن‌ها در کروموزوم‌ها به صورت افزایشی هستند, ولی اجزاء نوترکیبی به صورت افزایشی نیستند. به عنوان مثال کسر نوترکیبی A-C با مجموع نوترکیبی‌های AB و BC برابر نیست.

فاصله AC (r_{12}) بستگی به پدیده تداخل[۱] دارد.

فاصله A-B = r_1

فاصله B-C = r_2

فاصله A-C = r_3

اگر نوترکیبی بین A و B با احتمال r_1 مستقل از واقعه نوترکیبی B و C با احتمال r_2 باشد، می‌توان گفت که هیچ تداخلی وجود ندارد. در این حالت نوترکیبی بین A و C برابر است با:

$$r_{12} = r_1 + r_2 - 2r_1r_2$$

تداخل اثری است که در آن وقوع کراسینگ‌آور در یک مکان خاص احتمال کراس‌آور را در مکان مجاور خود تحت تاثیر قرار می‌دهد. موضوع مهم دیگر مبحث کراس آور مضاعف[۲] است. اگرتداخل کامل وجود داشته باشد، وقوع کراس‌آور در یک مکان خاص, مانع تشکیل کیاسما در مکانهای مجاور می گردد. در این حالت $r_{12} = r_1 + r_2$ می‌باشد و اجراء نوترکیبی به صورت افزایشی می‌باشند. در فواصل کم این رابطه صدق می‌کند و فراوانی نوترکیبی بین مکان ها افزایشی خواهد بود، ولی با افزایش فاصله این رابطه افزایشی نیست. با توجه به این که نوترکیبی (r) واحد فیزیکی برای اندازه‌گیری نیست و نظر به این که واحد فیزیکی سانتی مورگان تا حدی رابطه افزایشی با نوترکیبی دارد، لذا از روابط ریاضی با نام توابع نقشه یابی برای حل این مشکل استفاده می شود. پیش‌گویی تعداد کراسینگ‌اور از روی فراوانی نوترکیبی مشاهده شده در اصطلاح تابع نقشه نامیده می شود. در فواصل بسیار کم، تابع نقشه یابی رابطه مستقیم بین فاصله ژنتیکی و فواصل نوترکیبی بر قرار می‌کند و در چنین حالتی تابع نقشه برابر خواهد بود با :

(فاصله) d = r (کسر نوترکیبی)

۱۰- Interference

۱- Double crossover

با افزایش فاصله فیزیکی بین مکان ها, با فرض وجود یا عدم وجود تداخل می توان از توابع هالدن[۱] یا کوسامبی[۲] استفاده کرد.

تابع هالدن بر فرض عدم وجود تداخل استوار می باشد:

تابع هالدن: $d = \frac{1}{2}\ln(1-2r)$

در این روابط d فاصله بر حسب سانتی مورگان و r کسر نوترکیبی است.

حال زمانی که فاصله d را داشته باشیم می‌توانیم نوترکیبی را براساس فرمول زیر محاسبه کنیم.

$$r = \frac{1}{2}(1-e^{-2d})$$

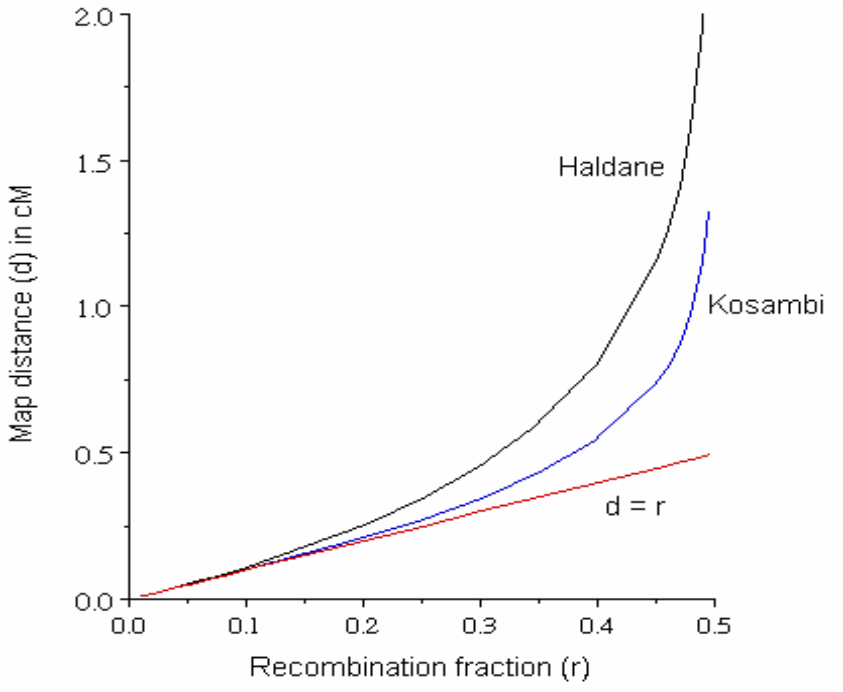
تابع کوسامبی بر فرض وجود تداخل استوار می باشد که به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$d = \frac{1}{4}\ln[(1+2r)/(1-2r)]$$

در فاصله کمتر از ۱۵ سانتی مورگان تفاوت بسیار کمی بین توابع نقشه‌یابی وجود دارد و می‌توان با اطمینان (فاصله) d را برابر با r (کسر نوترکیبی) در نظر گرفت. در مقادیر r کمتر از ۰/۱۵ هر سه نوع تابع نقشه مشابه‌اند، در حالی که در r کمتر از ۰/۲۵ توابع کوسامبی و سانتی مورگان به هم نزدیکترند (شکل ۱). تعداد نوترکیبی در دو جنس مؤنث و مذکر با هم برابر نیست و معمولاً در جنس هتروگامتیک کمتر است. به عنوان مثال در پستانداران نقشه جنس مؤنث طویل‌تر از نقشه جنس مذکر است و این به دلیل نوترکیبی بیشتر در جنس مؤنث است.

۱- Haldane function

۲- Kosambi's function



شکل۱- مقایسه توابع نقشه.

محور افقی فراوانی نوترکیب(r) و محور عمودی فاصله نقشه (d) یا تعداد کراسینگ‌اور قابل انتظار. برای یک r خاص مقدار فاصله نقشه هالدین بیشترین و مقدار سانتی مورگان کمترین است. در مقادیر r کمتر از ۰/۱۵ هر سه نوع تابع نقشه مشابه‌اند، در حالی که در r کمتر از ۰/۲۵ توابع کوسامبی و سانتی مورگان به هم نزدیکترند.

برآورد فراوانی نوترکیبی

فراوانی نوترکیبی توسط نسبت گامتهای نوترکیب به کل گامتها محاسبه می‌شود. این محاسبه زمانی راحت‌تر خواهد بود که اطلاعات کافی درباره مرحله (فاز) پیوستگی[۱] در والدین و فرم هاپلوئیدی[۲] (گامتی) که از والدین به نتاج رسیده است، موجود باشد. اگر فاز پیوستگی در والدین مشخص باشد می‌توان گفت که کدام گامت‌ها نوترکیب و کدام یک از گامت‌ها والدینی هستند، ولی در عمل فازهای پیوستگی همیشه

---

۱ - Linkage phase

۲ - Haplotype

معلوم نیست (به عنوان مثال در حیوانات، به دلیل مشکل بودن تهیه اینبرد لاین ها). اگر فاز پیوستگی مشخص نباشد، معمولاً می‌توان فاز پیوستگی والدین را از روی تعداد کمتر نوترکیب‌های مورد انتظار در مقایسه با تعداد بیشتر غیر نوترکیب‌ها مشخص نمود.

یکی از روشهای مورد استفاده جهت برآورد فراوانی نوترکیبی بین دو جایگاه, روش حداکثر درست نمایی[۱] می باشد.

روش حداکثر درست نمایی در برآورد فراوانی نوترکیبی

تابع درست نمایی احتمال مشاهده یکسری داده مشخص برای ارزش یک سری پارامترها است. در مطالعات پیوستگی مهمترین پارامتر فراوانی نوترکیبی است. با استفاده از توزیع دو جمله ای[۲] می‌توان احتمال مشاهده نوترکیب‌ها و برعکس را محاسبه نمود.

در تهیه نقشه پیوستگی بهتر است که تخمین‌ها به صورت آماری نیز مورد بررسی قرار گیرد. فراوانی نوترکیبی نسبت تابع درست نمایی به ازای مقادیری از r که مقدار تابع را حداکثر می کند به تابع درست نمایی با مقدار r =۰/۵ است. یا به عبارت دیگر نسبت تابع در حالتی که احتمال پیوستگی بین دو مکان وجود دارد، به مقدار تابع در حالتی که پیوستگی وجود ندارد (r = ۰/۵).

$$\frac{Likelihood(r=\hat{r})}{Likelihood(r=0.5)}$$

لگاریتم بر مبنای ۱۰ در رابطه فوق با LOD نشان داده می‌شود. به طور کلی مقدار LOD بیشتر از سه عموماً به عنوان نقطه بحرانی[۳] شناخته می‌شود و در چنین حالتی فرض صفر (r = ۰/۵) رد خواهد شد. لازم به ذکر است که۳ < LOD به صورت یک مقدار استاندارد نیست و بسته به شرایط می توان نقطه بحرانی را کمتر یا بیشتر از سه در نظر گرفت. نقطه بحرانی بیشتر LOD، گروه‌های پیوستگی بیشتر با تعداد نشانگر کمتر را تعیین می‌کند در حالی که نقطه بحرانی کمتر LOD، گروه‌های پیوستگی کمتر با تعداد بیشتر نشانگر در هر

۳ــ Maximum likelihood

۱- Binomial distribution

۲- Critical value

گروه را مشخص می‌کند. بنابراین در گیاهانی که نقشه ژنتیکی وجود ندارد در مرحله اول برای تهیه گروه‌های پیوستگی بهتر است مقادیر LOD کمتر در نظر گرفته شود تا نشانگرهای مولکولی بیشتری امکان اتصال به گروه‌های پیوستگی را داشته باشند. در گیاهانی که نقشه‌های ژنتیکی در حال کامل شدن دارند، استفاده از مقادیر بالاتر LOD امکان حذف نشانگرهای نامطمئن را فراهم می‌نماید.

معمولاً تعداد گروه‌های پیوستگی برابرتعداد کروموزوم‌های هاپلوئید گونه می‌باشد ولی در عمل به دلیل توزیع نامناسب نشانگرهای مولکولی در ژنوم امکان متفاوت بودن این دو وجود دارد. اختصاص دادن گروه‌های پیوستگی به کروموزوم‌ها با استفاده از گروه‌های آنیوپلوئیدی مثل نولی‌زومی‌ها و مونوزومی‌ها انجام می‌شود. ترکیب گروه‌های مختلف پیوستگی یک کروموزوم نیز از طریق آنیوپلوئیدها امکان پذیر می‌باشد.

از کاربردهای روش حداکثر درست نمایی علاوه بر برآورد فراوانی نوترکیبی, محاسبه یکسری از پارامترها (خصوصاً موقعیت و اثر QTL[۱]) براساس یکسری از داده‌های مشاهده شده فنوتیپی و ژنوتیپی می باشد. نسبت کسر درست نمایی را می توان بر حسب لگاریتم بر مبنای ۲ نیز بیان کرد که با فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\text{(نسبت درست نمایی)} = -2\ln\frac{Max_likelihood(reduced\bmod el)}{Max_likelihood(full\bmod el)}\ \mathrm{LR}$$

مراحل تهیه نقشه پیوستگی

امروزه نقشه های پیوستگی با انواع نشانگرهای DNA برای گیاهان مختلف در دسترس می باشند. ابزارهای لازم برای تهیه نقشه های پیوستگی عبارتند از:

۱- جمعیت در حال تفرق

۲- نشانگرهای ژنتیکی

۳- روش های آماری مناسب

۳- Quantative trait loci

جمعیت در حال تفرق

یکی از مهمترین اصول تهیه نقشه پیوستگی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی, تهیه جمعیت در حال تفرق مناسب می‌باشد. در تهیه جمعیت های مورد استفاده باید هدف از تهیه نقشه مشخص باشد. هدف از تهیه نقشه ژنتیکی می‌تواند ایجاد نقشه چهارچوبی[1] یا نقشه اولیه برای یکسری نشانگرهای مولکولی, مشخص کردن آرایش نشانگرهای ژنتیکی در نزدیکی ژن هدف و مکان‌یابی ژن‌های صفات کمی[2] یا هرمی کردن[3] مکان‌های مقاومت به بیماری باشد. بر اساس اهداف انتخاب نوع والدین، اندازه جمعیت و نسل مورد استفاده در تهیه نقشه ژنتیکی متفاوت خواهد بود.

چند شکلی ژنتیکی بین والدین[4]

در تهیه نقشه ژنتیکی چند شکلی کافی بین والدین مورد نیاز می‌باشد، در غیر اینصورت تهیه نقشه ژنتیکی با مشکل روبرو خواهد شد. به طور معمول گونه‌های دگرگشن مثل ذرت دارای چند شکلی بالایی هستند، بنابراین چند شکلی کافی بین والدین حاصل خواهد شد. در هر حال یکی از اساسی‌ترین مراحل در تهیه نقشه ژنتیکی انتخاب والدین است. میزان چند شکلی در والدین برحسب نوع نشانگر مورد استفاده هم می‌تواند متفاوت باشد.

انواع جمعیت های در حال تفرق

انواع مختلفی از جمعیت‌های ژنتیکی را می‌توان در تهیه نقشه ژنتیکی مورد استفاده قرار داد. تفاوت این جمعیت‌ها در میزان نوترکیبی، تعداد چرخه‌های میوزی و ثبات نو ترکیبی می‌باشد.

---

١ - Frame work

٣ - QTL mapping

٤ - Pyramiding

١ - Polymorphism

الف) جمعیت F_2:

اگر هیچ گونه اطلاعی درباره نحوه توارث صفت وجود نداشته باشد، اولین جمعیتی که پیشنهاد می‌شود جمعیت F_2 می‌باشد. در جمعیت‌های F_2 تمام ترکیبات آلل‌های والدینی وجود دارند. عیب عمده این جمعیت ها, وجود فقط یک چرخه میوزی در پروسه تولید جمعیت است. بنابراین فرصت برای نوترکیبی کم خواهد بود. در جمعیت‌هایی که فقط یک چرخه میوزی را در پروسه تولید طی می کنند، بهتر است اندازه جمعیت بزرگتر انتخاب شود. میزان اطلاعات نوترکیبی در جمعیتF_2 دو برابر جمعیت های حاصل از تلاقی بر گشتی(BC) است؛ زیرا در جمعیت F2 هر دو کروموزوم همولوگ نوترکیب بوده ولی در جمعیت BC فقط یکی از کروموزومهای همولوگ حاوی اطلاعات نوترکیبی می باشد. بیشترین اطلاعات ژنتیکی از جمعیت F_2 کامل به همراه نشانگرهای هم بارز به دست می آید.

ب) جمعیت تلاقی برگشتی (BC) [۱]:

جمعیت تلاقی برگشتی از تلاقی F_1 با یکی از والدین حاصل می شود. در این جمعیت‌ها یکی از ژنوتیپ‌های هموزیگوس وجود ندارد، بنابراین در جمعیت تلاقی برگشتی تمام ترکیبات والدینی وجود ندارد. از این رو میزان نوترکیبی در جمعیت تلاقی برگشتی نصف جمعیت F_2 است. در نتیجه، برای تشخیص یک اثر ژنی خاص با استفاده از جمعیت تلاقی برگشتی, اندازه جمعیت باید ۴ برابر جمعیت F_2 باشد. اگر صفتی توسط ژنهای غالب و مغلوب کنترل شود, با استفاده از جمعیت تلاقی برگشتی امکان مکان‌یابی تمام مکان‌های ژنی وجود نخواهد داشت و بسته به اینکه والد تلاقی داده شده کدام ژن را داشته باشد, فقط آن نوع ژن مکان‌یابی خواهد شد. از این رو، زمانی از جمعیت تلاقی برگشتی استفاده می‌شود که ماهیت ژن های کنترل کننده صفت مشخص باشد.

ج) جمعیت هاپلوئید مضاعف (DH) [۲]:

---

۱ - Backcross

۲ - Double haploid

این جمعیت‌ها به روش‌های مختلف تولید می‌شوند. در بیشتر این روش‌ها ابتدا گیاهان هاپلوئید تولید می‌شوند و سپس با موادی مثل کلشی‌سین کروموزوم‌های آنها مضاعف شده و تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف می‌نمایند. روش‌های مختلفی به منظور تولید گیاهان هاپلوئید وجود دارند. روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید در گندم شامل کشت بساک، کشت میکروسپور، تلاقی بین جنسی گندم× *Hordeum bulbosum* وگندم×ذرت می باشد. جمعیت‌های هاپلوئید مضاعف کاملاً خالص می‌باشند ولی اطلاعات نوترکیبی آنها نصف جمعیت F_2 می‌باشد. مهمترین مزیت جمعیت‌های هاپلوئید مضاعف هموزیگوس بودن آنهاست که امکان انجام آزمایش‌های تکراردار را فراهم می‌نماید و لذا در برنامه‌های مکان‌یابی امکان بررسی اثر متقابل محیط و مکان‌های ژنی کنترل کننده صفت کمی وجود خواهد داشت. عیب آنها همانند جمعیت‌های F_2 و تلاقی برگشتی داشتن یک چرخه میوزی است که با افزایش تعداد افراد جمعیت تا حدودی جبران خواهد شد.

د) جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب (RIL) [1]:

تفاوت اصلی RIL با سایر جمعیت‌ها این است که در فرایند تولید این جمعیت حدود ۹-۸ چرخهٔ میوزی وجود دارد. نوترکیبی در این جمعیت بسیار بالا بوده و تثبیت شده است، به همین دلیل ، RIL ها را جمعیت‌های دائمی می‌نامند. به علت هموزیگوس بودن همانند جمعیت‌های دابل هاپلوئید در آزمایش‌های تکرار دار و در بررسی اثر متقابل QTL و محیط استفاده می‌شوند. نشانگرهای بارز اطلاعات مشابهی همانند نشانگرهای هم بارز در جمعیت های RIL,DH,BC در فاز پیوستگی جفت تولید می نمایند. روند تولید لاین‌های اینبرد نوترکیب باعث می‌شود که هر کدام از این لاین‌ها حاوی ترکیبات مختلفی از بلوک‌های پیوستگی [2] والدین باشند. متفاوت بودن بلوکهای پیوستگی در هر لاین نوترکیب اساس و پایه تجزیه و تحلیل پیوستگی است. عیب عمده این جمعیت‌ها وقت‌گیر و هزینه‌بر بودن پروسه تولید آن می‌باشد.

---

١ - Recombinant Inbred Lines

٢ - Linkage blocks

اندازه جمعیت[۱]

یکی از عوامل مؤثر در صحت و دقت تهیه نقشه های پیوستگی و نیز مکان یابی ژنی، اندازه جمعیت است. در مکان یابی ژنی اندازه جمعیت به عوامل مختلفی بستگی دارد، یکی از مهمترین عوامل وراثت‌پذیری صفت می‌باشد. هرچه وراثت‌پذیری صفت کمتر باشد، اندازه جمعیت باید بزرگتر باشد. هدف از تهیه نقشه ژنتیکی نیز از عواملی است که اندازه جمعیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگر هدف مکان‌یابی ژن‌های صفات کمی با اثر کم باشد جمعیت بزرگتری مورد نیاز خواهد بود. براساس نتایج بدست آمده از دو محقق به نامهای Monte و Bevis جمعیت‌های کوچکتر از ۲۰۰ فرد به ندرت در یافتن QTLها مؤثر می‌باشند. در بسیاری از موارد جمعیت‌های بزرگتر از ۵۰۰ فرد به این منظور لازمند. Messeguer و همکاران در سال ۱۹۹۱ ۱۰۰۰ گیاه F_2 را به منظور تهیه نقشه ژنتیکی در گوجه فرنگی استفاده کردند. Stuber در سال ۱۹۸۷ از ۱۸۰۰ گیاه F_2 دریافتن QTL استفاده کرد و Alpert و Tanksley هم ۳۴۰۰ فرد را در تهیه نقشه کامل به منظور یافتن مکان ژنی کنترل کننده وزن میوه استفاده کردند. بنابراین چنین استنباط می‌شود که نوع جمعیت هم در تعداد افراد جمعیت تأثیرگذار است. جمعیت‌هایی مثل جمعیت RIL که بیش از یک چرخه میوزی دارند در مقایسه با جمعیتی مثل F_2 که یک چرخه میوزی دارد نیاز به تعداد افراد کمتری دارند.

پارامتر های مؤثر در دقت نقشه پیوستگی

۱- آزمون انحراف از تفرق

یکی از وقایع معمول در نقشه‌یابی ژنتیکی انحراف از نسبت‌های مورد انتظار(نسبت های مندلی) است که بالا بودن این مقدار انحراف می‌تواند در تجزیه و تحلیل پیوستگی اختلال ایجاد کند. آزمون مربع کای[۲]، نسبت انحراف از تفرق هر نشانگر را برای جمعیت‌های نقشه یابی محاسبه می‌کند. در گیاهان، انحراف از تفرق براساس گونه، نوع جمعیت، تلاقی‌ها و نوع نشانگرها متفاوت است. بیشترین میزان انحراف از تفرق در

۳- Population size

۱ –Chi-square

٤ – Mutation

جمعیت‌های هاپلوئید مضاعف (DH) و لاین‌های اینبرد نوترکیب(RILs) و نشانگرهای هم بارز و کمترین میزان انحراف از تفرق در جمعیت تلاقی برگشتی(BC) و نشانگرهای بارز می‌باشد. در جمعیت $F_۲$، نسبت مورد انتظار برای نشانگرهای بارز ۱:۲:۱ و برای نشانگرهای غالب این نسبت ۳:۱ می‌باشد.

۲- تعادل و عدم تعادل پیوستگی

به هم خوردن تعادل در پیوستگی به شانس با هم به ارث رسیدن آلل‌ها در مکان‌های ژنی مختلف اطلاق می‌گردد. اگر تعادل پیوستگی در جمعیت بر قرار باشد، فراوانی گامت‌های والدینی و نوترکیب برابر خواهد شد. با توجه به این‌که تهیه نقشه‌های پیوستگی براساس فراوانی نوترکیبی بین مکان‌های ژنی است، بنابراین هرچه عدم تعادل پیوستگی در جمعیت مورد استفاده شده بیشتر باشد، احتمال تعین پیوستگی بین مکان‌های ژنی با دقت بیشتر امکان‌پذیر خواهد شد. عدم تعادل پیوستگی عامل الزامی در تهیه نقشه پیوستگی می‌باشدکه به دلیل انتخاب[۱]، مهاجرت[۲]و جهش[۳] در جمعیت رخ می‌دهد.

نشانگرهای ژنتیکی در تهیه نقشه پیوستگی

نقشه های پیوستگی آرایش خطی از نشانگرهای ژنتیکی است که در آنها ترتیب و فاصله نشانگرها در هر گروه پیوستگی مشخص می شود. نشانگرها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند:

۱- نشانگرهای مورفولوژیکی

اگرچه اولین نقشه‌های پیوستگی بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی به وجود آمده‌اند، ولی این نشانگرها دارای محدودیت های اساسی هستند که توجه محققین به انواع دیگر نشانگرها را افزایش می‌دهد. این نشانگرها غالباً تحت تأثیر محیط قرار دارند و تعداد آنها کم می‌باشد.

۲- نشانگرهای مولکولی:

در دهه ۱۹۵۰، نشانگرهای مولکولی قابل مشاهده توسط الکتروفورز پروتئین‌ها تحول شگرفی را ایجاد نمودند. این نوع نشانگرها فرآورده نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند و در واقع انعکاسی از تنوع موجود در

۲- Selection

۳- Migration

سطح ردیف بازی ژنوم می‌باشند. از مهمترین انواع نشانگرهای بیوشیمیایی می‌توان به آیزوزایم[۱]ها و آلوزایم[۲]ها اشاره کرد. تا اواخر دهه ۱۹۷۰ نقشه‌های ژنتیکی تلفیقی (آیزوزایم‌ها و نشانگرهای مورفولوژیکی) در بسیاری از گونه‌های مهم تهیه شد. آیزوزایم‌ها دارای معایبی می‌باشند که از آن جمله محدودیت در تعداد نشانگرهای آیزوزایم و محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت در آن‌ها است. این محدودیت ها باعث شد که محققین در تهیه نقشه پیوستگی از نشانگرهای مبتنی بر DNA استفاده نمایند که این گروه از نشانگرها به دو گروه کلی تقسیم می شوند:

الف- نشانگرهای مبتنی بر دو رگ گیری اسیدهای نوکلئیک:

این دسته از نشانگرها شامل «تفاوت طول و قطعات حاصل از برش DNA توسط آنزیم‌های برشی (RFLP)[۳] ، پویش ژنومی نشانه‌های هضم(RLGS) [۴] و تعداد متفاوت ردیف‌های تکراری(VNTR) [۵]می‌باشند.

ب- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز:

این دسته از نشانگرها می توان به نشانگرهای RAPD[۶] ، DAF[۷] ، SSR[۸] ، STS[۹] ، ISSR[۱۰] ، AFLP[۱۱] AFLP[۱۱] و RGA[۱۲] اشاره نمود.

۱- Isozyme

۲- Allozyme

۳- Restrictian Fragment Length Polymorphism

٤- Restriction Landmark Genomic Scanning

٥- Variable Number of Tandem Repeat

٦- Random Amplification Polymorphic DNA

۷- DNA Amplification Fingerprinting

۸- Simple Sequence Repeat

۹- Sequence – Tagged Sites

۱۰- Inter Simple Sequence Repeat

۱۱-Amplified Fragment Length Polymorphism

۱۲-Resistance Gene Analogues

نشانگرهای مورد استفاده در تهیه نقشه‌های پیوستگی

در این مبحث سعی بر آن است که نکاتی در رابطه با نشانگرهای مولکولی مورد نیاز در تهیه نقشه‌های پیوستگی اشاره گردد. در این رابطه تقسیم‌بندی دیگری از نشانگرها می‌توان ارائه کرد که در تهیه نقشه‌های پیوستگی کاربرد فراوانی دارند.

۱- نشانگرهای اختصاصی[۱]:

به نشانگرهایی اطلاق می‌گردد که جایگاه ژنومی آن ها مشخص است که از آن جمله می‌توان به نشانگرهای RFLP (با کاوشگر تک مکانی) و SSR اشاره نمود.

۲- نشانگرهای تصادفی[۲]:

به نشانگرهای اطلاق می‌گردد که جایگاه کروموزومی آ نها معلوم نبوده و در مناطق مختلف ژنوم قرار دارند معمولاً درتهیه نقشه ژنتیکی فواصل نشانگرهای اختصاصی را پر می‌کنند که نشانگرهای RAPD ، DAF ، ISSR ، AFLP از جمله این نشانگرها هستند.

مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی[۳]

یکی از کاربردهای مهم نقشه‌های ژنتیکی در مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی می‌باشد. بیشتر صفات اقتصادی در گیاهان و جانوران مانند عملکرد دارای توراث کمی هستند و معمولاً تعداد زیادی ژن کوچک و بزرگ اثر، تظاهر این صفات را کنترل می‌کنند. بدلیل تعداد زیاد ژن، عوامل محیطی نیز سهم مهمی در کنترل این صفات دارند. هرچند که با روش‌های کلاسیک امکان برآورد تعداد ژن‌ها وجود دارد، ولی تعیین محل ژن‌ها، اثر و سهم ژن‌های منفرد در تغییرات فنوتیپی صفت امکان‌پذیر نمی‌باشد. با پیشرفت در

۱- Specific markers

۲- Random markers

۱- QTL mapping

زمینه بیولوژی مولکولی و توسعه روش‌های مولکولی همراه با مدل‌ها و روش‌های آماری امروزه علاوه بر تعیین محل هر ژن، امکان تعیین سهم تک‌تک ژن‌های مکان‌یابی شده در تظاهر صفت نیز فراهم آمده است. مکان‌یابی QTL ها بر پایه ارتباط نشانگرها و تغییرات فنوتیپی صفت موردنظر استوار است.

روشهای مکان‌یابی ژن‌های صفات کمی

الف) تجزیه تک نشانگری[1]:

در تجزیه تک نشانگری مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی شامل بررسی ارتباط بین ارزش فنوتیپی صفت و ژنوتیپ تک نشانگر است. در روش تجزیه تک نشانگری، مدل‌های خطی برای آزمون رابطه یک نشانگر و تغییرات فنوتیپی صفت جهت مکان‌یابی QTL استفاده می‌شوند. به این ترتیب که ابتدا افراد جمعیت براساس ژنوتیپ نشانگر به کلاس‌های مجزا تقسیم و برای هر گروه میانگین و واریانس صفت مورد مطالعه محاسبه می‌شود. در صورت وجود QTL در حوزه نشانگر مورد بررسی، اختلاف بین کلاس‌های نشانگر معنی‌دار خواهد بود. در این روش، در هر مکان ژنی نشانگر، ارتباط صفت با نشانگر توسط روش‌های مختلف آماری برآورد می‌شود. برای آزمون فرضیه‌ها در این روش می‌توان از تجزیه رگرسیون, تجزیه واریانس, آزمون t و روش حداکثر درست نمایی استفاده کرد. علیرغم سادگی روش, ادغام اثر QTL با فاصله آن از نشانگر, ادغام اثر QTL های دیگر با اثر QTL شناسایی شده از معایب عمده این روش می‌باشند.

ب) مکان‌یابی فاصله‌ای ساده[2]

برای برطرف کردن برخی معایب روش تجزیه تک نشانگری لندر و بوت استن در سال ۱۹۸۹ روش مکان‌یابی فاصله‌ای ساده (SIM) را ابداع کردند. در این روش وجود نقشه ژنتیکی پیوستگی از قبل تهیه شده الزامی است و در هر بار آزمون فاصله بین دو نشانگر مجاوربرای وجود QTL فرضی بررسی می‌گردد . در این روش بر خلاف روش تجزیه تک نشانگری, امکان استفاده از افرادی با داده‌های گم شده برای یک

۲- Single marker analysis

۱- Simple Interval Mapping

نشانگر وجود دارد. همچنین تعداد افراد مورد نیاز در این روش برای شناسایی QTL هایی با اثر معین کم تر از روش تجزیه تک نشانگری می باشد با این وجود نتایج SIM همانند تجزیه تک نشانگری, با فرض وجود یک QTL در حوزه نشانگر یا حد فاصل دو نشانگر معتبر است و در صورت وجود QTL های دیگر, اثرQTL ها بیشتر و تعداد آنها کمتر برآورد خواهد شد.

ج) مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب[1]

با توجه به مشکلات روشهای قبلی, زنگ و همکاران (۱۹۹۴) و Stam و همکاران (۱۹۹۴) همزمان روشی را ابداع کردند که امروزه به مکان یابی فاصله ای مرکب (CIM) معروف است. روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب از خصوصیات رگرسیون چندگانه و روش حداکثر درست نمایی یا فقط از روش رگرسیون چندگانه برای مکان یابی و برآورد اثرات QTL در فاصله بین دو نشانگر با حذف اثر QTLهای خارج از این فاصله استفاده می‌کند. به عبارت دیگر این روش بسط روش مکان‌یابی فاصله‌ای ساده با انتخاب تعدادی نشانگر علاوه بر دو نشانگر موردنظر به عنوان کوفاکتور[2] برای حذف تغییرات ژنتیکی ناشی از سایر QTLهای پیوسته و یا ناپیوسته با QTL موردنظر می‌باشد.

یکی از مشکلات استفاده از مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب انتخاب نشانگرها به عنوان کوفاکتور می‌باشد و هنوز راه حل ساده برای این سؤال که کدام نشانگرها باید به عنوان کوفاکتور در تجزیه استفاده شود وجود ندارد. استفاده از تعداد کم نشانگر به عنوان کوفاکتور هدف کاهش واریانس ناشی از سایر QTLها را برآورد نمی‌کند و انتخاب تعداد زیاد نشانگر به عنوان کوفاکتور در مدل سبب کاهش قدرت آزمون خواهد شد. در برنامه‌های PLABQTL و QTL Cartographer از روش رگرسیون چند مرحله‌ای جهت تشخیص کوفاکتور ها استفاده می کنند.

۲- Composite Interval Mapping

۱- Cofactor

د) روشهای پیشرفته

امروزه روش های آماری بسیار پیشرفته در مکان یابی QTL استفاده می شوند. یکی از این روش ها استفاده از تئوری بیسین[۱] در بررسی ترکیبات مختلف QTL، مکان QTL و قدرت واثر QTL می باشد.

زو (۱۹۹۸) برای مکان‌یابی QTLها از مدلهای خطی مخلوط بر پایه روش مکان‌یابی فاصله‌ای استفاده کرده است که برخلاف روش‌های مکان‌یابی فاصله‌ای اثر نشانگرها به صورت تصادفی در نظر گرفته می‌شوند.

درواسی در سال ۱۹۹۸ تجزیه QTL را به سه مرحله تقسیم نمود.

۱- مرحله یافتن[۲] QTL

در این مرحله امکان وقوع QTLها در بین نشانگرها برآورد می گردد

۲- مکان‌یابی QTL

با استفاده از نرم‌افزارهای خاص موقعیت QTLها روی کروموزوم و در ارتباط با نشانگرهای خاص مشخص می شود.

۳- مکان‌یابی خوب[۳]

در این مرحله مکان یابی دقیق QTLهای بزرگ اثر و کوچک اثر در فواصل غنی از نشانگر تعیین می‌شود. یکی از مشکلات مکان‌یابی QTL فقدان نقشه‌های پیوستگی اشباع شده از نشانگرهاست. از این رو، درواسی و سولر (۱۹۹۷) رابطه‌ای برای نقشه‌های پیوستگی با تراکم بالای نشانگر ارائه نمودند:

$$CI95 = 3000/kN\alpha^2$$

۲- Bayesian

۳- Detection

٤- Fine mapping

در این رابطه CI نشان دهنده ۹۵٪ فاصله اطمینان برای موقعیت مکـانی بـر حسـب سـانتی مورگـان، k تعـداد ترکیبات والدینی به ارث رسیده در هر فرد (k در جمعیت تلاقی برگشتی یـک و در جمعیـت F_2 دو در نظـر گرفته می‌شود)، N تعداد افراد مؤثر در جمعیت و α اثر جایگزینی آلل در QTL است.

توانایی آزمون‌های آماری در مکان یابی QTL

توانایی آزمون های آماری در مکان یابی QTL, به قدرت روش‌های آماری مورد استفاده, نوع جمعیت, اندازه جمعیت و وراثت پذیری صفت بستگی دارد. به طور کلی در صفتی با وراثت پذیری پایین, QTL ها کوچک اثر هستند و نیاز به اندازه جمعیت بزرگتر می باشد. QTLها را با در نظر گرفتن سهم آنها در تبیین واریانس فنوتیپی صفت می توان به سه گروه تقسیم کرد:

الف) QTLهای بزرگ اثر[۱]

QTLهایی هستند که بیش از ۲۰ درصد واریانس فنوتیپی صفت را توجیه می‌کنند.

ب) QTLهای کوچک اثر[۲]

آنهایی هستند که یک درصد یا کمتر از یک درصد از واریانس صفت را تبیین می کنند. برای مکان یابی چنین QTL هایی نیاز به جمعیت های بزرگ ونقشه های ژنتیکی اشباع می باشد.

ج) QTLهای حدواسط[۳]

این QTLها حدواسط QTLهای قوی و ضعیف می‌باشند. در این نوع از QTLها معمولاً اندازه جمعیت منطقی و قابل قبولی استفاده می‌شود .

دو احتمال در یافتن QTLهای ضعیف وجود دارد:

۱- تمام QTLها یافت نشوند

---

۱ - Strong QTLs

۲ - Weak QTLs

۳ - Moderate QTLs

۲- QTLهایی هم که پیدا می‌شوند بیش از حد تخمین زده شوند.

بنابراین در رابطه با یافتن QTL، نوع تلاقی و غالبیت آلل‌های QTL و فضای بین نشانگرها از عوامل مؤثر می‌باشند. در یافتن QTLهای افزایشی جمعیت $F_۲$ مناسب‌تر از جمعیت تلاقی برگشتی است ولی برای QTLهای غالب، جمعیت تلاقی برگشتی و $F_۲$ از نظر قدرت تقریباً یکسان عمل می‌کنند.

زمانی که یک QTL از نشانگر مجاور خود توسط کسر نوترکیبی r، مجزا می‌شود، تعداد نتاجی که برای یافتن این QTL مورد استفاده قرار می‌گیرند با فاکتور $(1-2r)^{-2}$ افزایش می‌یابد. بنابراین فاصله نشانگرها در حدود ۱۰ تا ۲۰ سانتی مورگان مطلوب می‌باشد. مگر اینکه QTL، جزو QTLهای ضعیف و کوچک اثر باشد.

درست نمایی برای محاسبه یکسری از پارامترها (خصوصاً موقعیت QTL و اثر QTL) براساس یکسری داده مشاهده شده فنوتیپی و ژنوتیپی استوار است و تخمین در جایی صحیح‌تر است که درست نمایی بیشتر باشد. مشکلی که این روش دارد این است که دقت این روش در مورد QTLهای قوی مناسب است ولی در مورد QTLهای ضعیف در بعضی موارد به اشکال برمی‌خورد. دارواسی در سال ۱۹۹۸ در QTLهای حدواسط عبارت $\frac{530}{NV}$ را جهت فاصله اطمینان ۹۵ درصد ارائه کرد که در آن N اندازه جمعیت و V نسبت واریانس می‌باشد. به هر حال روش نمونه‌برداری مجدد[۱] دقیق‌ترین روش جهت تخمین فاصله اطمینان می‌باشد.

گاهی مواقع تمام QTLهای موجود در یک فاصله به عنوان یک QTL تخمین زده می‌شوند و در بعضی مواقع اثر QTL با فاصله آن از نشانگر ادغام می‌شود. ویتاکر در سال ۱۹۹۶ عبارت QTL ایزوله[۲] را مطرح کرد که در آن یک QTL به طور مستقل از سایر QTLها تخمین زده می‌شود. در این روش از روش‌های رگرسیون استفاده می‌شود. QTL ایزوله عبارت از QTLی است که در آن فاصله نشانگری، QTL دیگری وجود ندارد یا اینکه QTLی با اثر مثبت یا تقویت کننده QTL اول قرار داشته باشد. QTLهای غیر

۱- Resampling

۲- Isolated QTL

ایزوله توسط روشهای رگرسیون تخمین زده نمی‌شوند. بطورکلی روش‌های حداکثر درست نمایی قادر به محاسبه QTLهای غیر ایزوله هستند.

نرم افزارهای تهیه نقشه ژنتیکی و مکان یابی ژنهای کنترل کننده صفات کمی

نرم‌افزارهای مورد استفاده در مکان‌یابی صفات کمی متنوع‌تر از نرم‌افزارهای مورد استفاده در تهیه نقشه ژنتیکی است.

۱- نرم افزارهای مورد استفاده در تهیه نقشه ژنتیکی

ساده‌ترین حالت برای تهیه نقشه پیوستگی از نشانگرهای مولکولی استفاده از نرم‌افزارهای آماری می‌باشد که قادرند تجزیه مربع کای[۱] را انجام دهند. این آزمون آماری تجزیه و پیوستگی دو نقطه‌ای[۲] بین نشانگرها را مشخص می‌کند که اساس تهیه گروههای پیوستگی است. مشکلی که این روش دارد این است که زمانی که تعداد نشانگرها زیاد می‌شود این تکنیک توانایی کافی در مقایسه ترتیب‌های ممکن و انتخاب بهترین ترتیب‌ها را نخواهد داشت. البته هنوز هم در مواقعی که تعداد نشانگرها کم باشد از این شیوه بهره گرفته می‌شود.

در بیشتر پروژه‌های تهیه نقشه ژنتیکی معمولترین نرم‌افزار مورد استفاده نرم افزار Mapmaker است که در سال ۱۹۸۷ توسط Lander و همکاران معرفی شد. تجزیه پیوستگی در نرم‌افزار Mapmaker براساس روش حداکثر درست نمایی و معیار LOD می‌باشد . در گیاهان معمولترین نرم‌افزار مورد استفاده در تهیه نقشه ژنتیکی، نرم‌افزار Mapmaker می‌باشد. حسن نرم افزار Mapmaker این است که توانایی تجزیه چند نقطه‌ای[۳] بسیاری از مکان‌های پیوسته را دارا می‌باشد. اکثر نقشه‌های پیوستگی گیاهان حداقل دارای ۱۰۰ نشانگر می‌باشند و گاهی تعداد نشانگرها به ۱۰۰۰ عدد یا بیشتر هم می‌رسد. بنابراین تجزیه چندنطقه‌ای سریع

۱- Chi-square

۲- Two point

۳- Three point

و آسان به منظور ترتیب کردن حالتهای مختلف نشانگرها لازم به نظر می‌رسد. در نرم افزار Mapmaker تسهیلاتی به منظور تجزیه چند نقطه‌ای وجود داردکه عبارتند از الگوریتمی که گروههای نشانگری را به محتملترین گروه پیوستگی ارتباط می‌دهد و مکانیسم دیگر تعیین بهترین ترتیب می‌باشد. الگوریتم دیگری که اطمینان ترتیب‌ها را بیشتر می‌کند در دستوری به نام «ripple» قرار دارد. در این دستور باز هم تجزیه سه نقطه‌ای صورت می‌گیرد ولی در پایان تجزیه چند نقطه‌ای با تمام نشانگرهای لنگری صورت می‌پذیرد و حداکثر درست نمایی در بهترین ترتیب بدست می آید.

گاهی مواقع نیاز است که نقشه ژنتیکی یک جمعیت با آنهایی که از یک جمعیت دیگر حاصل شده‌اند ارتباط داده شوند در این صورت از برنامه کامپیوتری Join map استفاده می شود که توسط Stam در سال ۱۹۹۳ ارائه شد. به منظور ترسیم اشکال کروموزومها و نشان دادن موقعیت نشانگرها روی کروموزوم از برنامه کامپیوتری Drawmap استفاده می شود که توسط Van ooijen در سال ۱۹۹۴ ارائه گردید.

۲- نرم‌افزارهای مورد استفاده در مکان‌یابی ژنهای کنترل کننده صفات کمی

حدود ده برنامه‌کامپیوتری در مکان‌یابی صفات کمی وجود دارد. تقریباُ تمام برنامه‌ها آزمون تجزیه تک نشانگری و مکان‌یابی فاصله‌ای ساده و مرکب را در جمعیت‌های تلاقی برگشتی، F_2 و اینبرد لاین‌های نوترکیب (RIL) انجام می‌دهند. به غیر از برنامه Map manager QT تمام برنامه‌ها نیاز به داده‌های ورودی به فرمت خاصی از text file دارند و تمام برنامه‌ها نیاز به نقشه‌های ژنتیکی از قبل تهیه شده دارند. برنامه‌های Map manager QT، Q-gene، QTL cafe و Epistat حالت گرافیکی دارند و کار کردن با آنها ساده‌تر است. در برنامه‌های PLAB QTL و Multimapper بایستی یک برنامه اولیه نوشته شود تا عمل برنامه مشخص شود و بعد از آن نیازی به وارد کردن برنامه‌های ورودی نیست. برنامه‌های دیگر مثل Mapmaker/QTLتحت Dos بوده و دائماً بایستی دستورهای لازم را به آن داد.

معمول‌ترین نرم‌افزار مورد استفاده در مکان‌یابی صفات کمی نرم‌افزار Mapmaker/QTL است که در سال ۱۹۹۲ توسط Lincoln و همکاران معرفی شد. این نرم افزار توانایی انجام مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب را دارد.

منابع:

Burr,B.Thompson,K.H, Albersten,M.C,Stuber,C.W. 1988.Gene mapping with recombinant inbreds in maize.Genetics 118:519-526.

Burr,F.A.1991.Recombinant inbred for molecular mapping in maize.Trends genet.7:55-60.

Darvasi,A.1998.Experimental strategies for the genetic dissection of comlex traits in animal models.Nat Genet 18:19-24.

Harushima,Y, Yano,M, Shomura,A, Sato,M, Shimano,T, Kuboki,Y, Yamamoto T, Lin S.Y, Antonio,B.A, Parco ,A, Kajiya,H, Huang ,N, Yamamoto, K, Nagamura ,Y, Kurata, N, Khush ,G.S, Sasaki, T. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population**.** Genetics 148:479-494.

Kammholz,s.J, Campbell,A.W, Sutherland,M.W, hollamby,G.J, Martin,P.J, Estwood,R.F, Barclay,I, Wilson,R.E, Brennan,P.S, Sheppard,J.A. 2001. Establishment and characterization of wheat genetic mapping populations. Aust.J.Agric.res 52:1079-1088.

Lander,E.S, Botstein,D. 1989.Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps.Genetics 121,185-199.

Lander,E.S, Green,P, Abrahamson,J,Barlow ,A, Daley,M.1987. MAPMAKER: an intractive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181.

Manly,K.F, Olson,J.M.1999.Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. Mamalian Genome 10:327-334.

McCouch,S.R, Kochert,G, Yu,z.Y, khush,G.S, Coffman,W.R, Tanksley,S.D.1988. Molecular mapping of rice chromosomes.Theor.Appl.Genet 76:815-829.

Messmer. M.M. , Keller M. , Zanetti .S. , Keller.B.1999. Genetic Linkage map of wheat. x spelt cross Theor. Appl .Genet 98 : 1163-1170 .

Satagopan,J.M,Yandell,B.S, Newton,M.A,Osborn,T.C.1996.A Bayesian approach to detect quantitative trait loci using Markov chain Monte Carlo. Genetics 144:805-816.

Satm,P.1993.Construction of integrated genetic linkage maps by a means of a new computer package .Joinmap.Plant Journ 3:739-744.

Staub,J.E,Serquen.C.1996.Genetic markers ,map construction,and their application in plant breeding.Hort science 31(5):729-740.

Tanksley,S.D, Ganal,M.W, Prince,J.P, Vicente,M.C,Bonierbale,M.W, Broun,P, Fulton,T.M, Giovannoni,J.J, Grandillo,S, Martin,G.B, Messiguer,R, Miller,J.C, Miller,L ,Paterson,A.H, pineda,O, Roder,M.S, Wing,R.A, Wu,W,Young,N.D.1992.High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes.Genetics 132:1141-1160.

Van ooijen, J. W. 1994.DrawMap a computer program for drawing genetic linkage maps. J. Hered. 85:66.

Wagner, A. 2002.Genome mapping and Sequencing. Genome and computational Biology

Whittaker,J.C, Thompson R, Haley,CS,Visscher,P.M.1996.On the mapping of QTL by regression of phenotype on marker type.Heridity 77:23-32.

Young,N.D.Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers.DNA- based markers in plants .31-47.

Zeng,Z.B.1994. Percision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136:1457-1468.