جوامع نقشه یابی (قسمت پنجم)

Mapping Populations (part five)

مصطفی حق‌پناه

Haghpanah.m@arc-ordc.ir

کارشناس ارشد اصلاح نباتات، مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

لاین‌های خالص نوترکیب که به اختصار RILs (recombinant inbred lines) نامیده می‌شوند از مجموعه‌ای از لاین‌های هموزیگوت پدید می‌آیند که به واسطه چند نسل خودگشنی گیاهان F_2 حاصل می‌شوند. لاین‌های خالص نوترکیب (RILs) را به دلیل حاصل شدن از جمعیت F_2 که به روش نسل تک بذر در طی چند نسل (Single Seed Descent)، لاین‌های خالص مشتق شده از F_2 یا لاین‌های نسل تک بذر می‌نامند. نقشه‌یابی با استفاده از لاین‌های خالص نوترکیب اولین بار در موش حاصل شد، محققین در آن بررسی با استفاده از ۲۰ نسل تلاقی خواهری (Sib-mating) به سطح قابل قبولی از هتروزیگوسیتی رسیدند. یک جمعیت خالص نوترکیب شامل RIL هایی است که از یک تلاقی مناسب حاصل گردیده‌اند. در صورت امکان گیاهان F_2 و فرزندانشان می‌بایست خودگشن شوند ولی اگر بنا بر هر دلیلی خودگشنی امکان پذیر نباشد می‌توان از تلاقی خواهری استفاده کرد. با هر نسل خودگشنی، هتروزیگوسیتی ۵۰ درصد کاهش می‌یابد ولی با هر نسل تلاقی خواهری فقط کاهش ۲۵ درصدی هتروزیگوسیتی را شاهد هستیم. درنتیجه با استفاده از خودگشنی زمان رسیدن به هموزیگوسیتی نصف زمان استفاده از تلاقی خواهری است. همچنین برای دستیابی به لاین‌های خالص نوترکیب تعداد گیاهان F_2 برای تلاقی خواهری نسبت به خودگشنی دو برابر می‌باشد. هر چند که برای تولید لاین‌های خالص نوترکیب از روش‌های شجره‌ای بدون انتخاب و بالک استفاده می‌شود اما مناسب‌ترین روش برای ایجاد این لاین‌ها SSD (نسل تک بذر) می‌باشد. بسیار مهم است که نسل‌های پیشرفته در شرایط محیطی مناسب کشت گردند تا تمامی ژنوتیپ‌های حاصله شانس برابر برای بقاء داشته باشند و هیچ فشار انتخابی بر ژنوتیپ خاصی وارد نشود. از روش نسل تک بذر بیش از چهار نسل و کمتر از هشت نسل استفاده می‌شود. در این روش از هر بوته F_2 یک بذر برداشت شده تا نسل بعدی را به وجود آورند و این روند در هر نسل تا رسیدن به هدف مطالعه ادامه می‌یابد. در این روش بذور حاصل از هر نسل با یکدیگر مخلوط می‌شوند. در پایان بذور هر بوته به عنوان یک لاین خالص، جداگانه برداشت می‌شوند و از هر بذر، یک بوته به عنوان یک فرد در جمعیت SSD استفاده می‌گردد. ممکن است برخی از گیاهان (ژنوتیپ‌ها) بنا به دلایلی مانند قوه نامیه نامناسب بذر، عدم توانایی تولید مثل گیاه، عدم توانایی زنده ماندن گیاه به دلیل تراکم کاشت بالا و غیره در طی مراحل SSD از بین بروند. هر نسل خودگشنی میزان هتروزیگوسیتی را نسبت به نسل قبل نصف کرده و به همین اندازه هموزیگوسیتی را افزایش می‌دهد. درنتیجه در جمعیت RIL $F_{4:5}$ مقدار هموزیگوسیتی یک لوکوس مشخص

در تک بوته حدود ۹۲/۲۵ درصد و در کل جمعیت حدود ۸۷/۵ برآورد می‌گردد (جدول ۱).

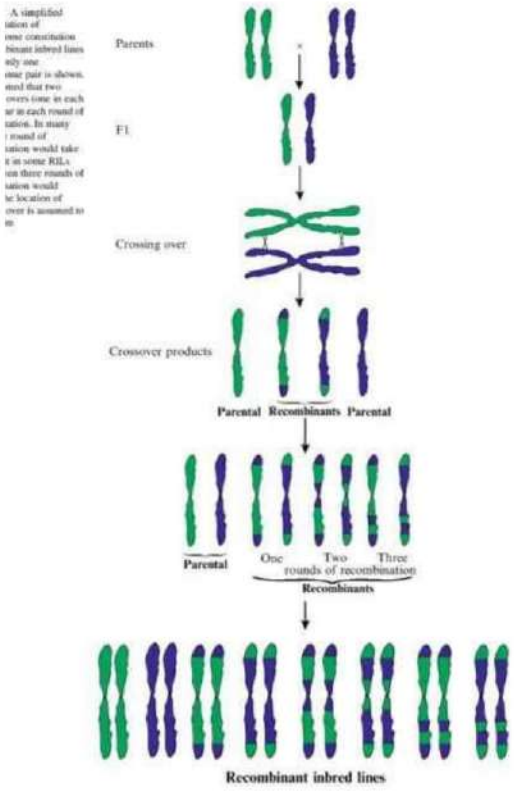
جدول ۱ - سطح هموزیگوسیتی یک لوکوس در بوته و جمعیت RIL طی نسل‌های در حال افتراق

RIL population	Percent homozygosity at each locus	
	At individual plant level[a]	At RIL level[b]
$F_{3:4}$	87.50	75.00
$F_{4:5}$	93.75	87.50
$F_{5:6}$	96.875	93.75
$F_{6:7}$	98.438	96.875
$F_{7:8}$	99.219	98.438
$F_{8:9}$	99.609	99.219

[a]Homozygosity estimated as percent of homozygous plants in the RIL population
[b]Homozygosity estimated as percent of homogeneous RILs in the RIL population

جمعیت لاین نوترکیب $F_{4:5}$ به روش SSD تا نسل F_4 اداره می‌گردند و هر بوته F_4 به‌طور جداگانه برداشت شده و به عنوان یک نسل F_5 کشت می‌شوند. باید در نظر داشت که با پیشرفت نسل‌ها مقدار هموزیگوسیتی در هر بوته افزایش می‌یابد بخصوص در جوامع $F_{4:6}$ و $F_{4:7}$ و سایر نسل‌های مشتق شده از F_4، اما میزان هموزیگوسیتی در RIL در سطح $F_{4:5}$ باقی می‌مانند. روند مطرح شده، حاصل مجموعه‌ای از لاین‌ها است که هر لاین شامل ترکیب متفاوتی از بلوک‌های ژنی پیوسته والدین بوده و برای بررسی پیوستگی ژن‌ها بسیار مناسب می‌باشد (شکل ۱).

جمعیت RIL شامل دو ژنوتیپ هموزیگوت (AA وaa) با فراوانی بالا و مقدار نسبتاً اندک هتروزیگوت (Aa) در یک لوکوس می‌باشد که مقدار هتروزیگوت وابسته به تعداد نسل اداره شده به روش SSD می‌باشد. فراوانی مورد انتظار دو ژنوتیپ هموزیگوت در این جمعیت برابر با ۱:۱ است. درنتیجه به دلیل مقدار ناچیز هتروزیگوسیتی، مقدار اطلاعات به دست آمده از نشانگرهای غالب و همبارز در این جوامع یکسان می‌باشد. علاوه بر آن جمعیت‌های RIL نسبت به جوامع F_2، DH و BC امکان تشخیص دقیق‌تر مکان نشانگرها با ژن مورد نظر را فراهم می‌کند و جمعیت مناسبی برای نقشه‌یابی (Association mapping) ارتباطی می‌باشند.



شکل ۱- ساختار ژنی در نسل RIL

منبع:

Singh, B. D., and Singh, A. K. (2015). Marker-assisted plant breeding: principles and practices. New Delhi, India: Springer.