انجام نقشه یابی مولکولی و گزینش به کمک مارکر برای بهبود صفات کمی و کیفی گیاهان زراعی

مقدمه

اگرچه، گیاهان زراعی در ابتدا بواسطه نتایج جستجوی غیرهدفمند انسان (برای منابع مناسب غذا) رو به تکامل نهادند امروزه این امر بیشتر از طریق برنامه های اصلاحی مدبرانه حاصل می شود. در حالیکه تغییرات در فعالیتهای زراعی و مکانیزاسیون کشاورزی، تاثیر چشمگیری بر بهره وری زراعی داشته اند، بهبود عملکرد اغلب گیاهان به سبب بهبود ژنتیکی آنها بوده است. علیرغم پیشرفتهای حاصله، بهبود بیشتر عملکرد و کیفیت محصولات، به سبب رشد جمعیت، افزایش قیمت نهاده هایی چون آب، کود و انرژی و ملاحظات مربوط به اثرات کودها و سموم شیمیایی بر زیست بوم و تغییر سریع سلایق مصرف کنندگان، مورد درخواست مستمر قرار دارد.

اصلاح نباتات، بعنوان فرآیند مورد استفاده در طی قرنها، به میزان زیادی به گزینش صفات مطلوب بستگی دارد. این گزینشها اغلب شامل چرخه های متعدد اصلاحی بمنظور انتقال خصوصیات مطلوب زراعی و کیفی از والدین متفاوت به یک ژنوتیپ منفرد می باشند. پیشرفتهای جدید در بیوتکنولوژی منجر به توسعه ابزارهای بدیعی که نوید بخش اصلاح نباتات سریعتر و دقیق تر می باشند شده است. در این میان، مارکرهای مولکولی نوید بخش ترین ابزارها هستند. مارکرهای مولکولی قطعاتی از DNA گیاه هستند که اصلاحگران برای تشخیص حضور و یا عدم حضور آللهای مورد علاقه در گیاهان مورد آزمایش بکار می برند و بنابراین از آنها بعنوان ابزارهای گزینش بهره می برند. گزینش گیاهان مطلوب برپایه مارکرهای متصله را در اصطلاح گزینش به کمک مارکر(MAS) نامند. با استفاده از مارکرهای مولکولی، اصلاحگران می توانند روشهای گزینش برپایه فنوتیپ، که شامل گیاهان در حال رشد تا گیاهان بالغ است، را کوتاهتر ساخته و خصوصیات فیزیکی آنها را بمنظور آگاهی از ساختار بنیادین ژنتیکی آنها مورد

بررسی دقیق قرار دهند. سیستمهای مارکرهای مولکولی مختلف توسعه یافته و برای استفاده تکامل یافته اند.

انواع مارکرهای مولکولی

RFLP-۱

پلی مرفیسم های طولی قطعات برشی (RFLP)، با استفاده از آنزیمهای برشی که مولکولهای DNA ژنومی را در توالی های نوکلوتیدی خاصی (محل های برش) برش داده و بنابراین قطعات DNA با اندازه های مختلف را بوجود می آورند، شناسایی می شوند. شناسایی قطعات DNA ژنومی بوسیله ساترن بلات انجام می شود، فرآیندی که بموجب آن قطعات DNA جدا شده بوسیله الکتروفورز، به فیلتر نایلونی یا نیتروسلولز منتقل می شوند. سپس، DNA غیر متحرک در فیلتر اجازه می یابد تا با DNA پروب رادیواکتیویته هیبرید شود. RFLP یک مارکر همبارز است که پروبها معمولا قطعاتDNA کلون شده کوچک (بعنوان مثالcDNA و یا DNA ژنومی) هستند. فیلتر در مقابل فیلم عکاسی قرار می گیرد. جایی که تابش ماده رادیو ایزوتوپ از پروب، سبب تولید باندهای مرئی می شود.

RAPD-۲

DNA پلی مورفیسم تکثیر یافته تصادفی (RAPD) یک مارکر غالب بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) است. این روش یک پرایمر دیکامر منفرد از توالی تصادفی را بکار می گیرد که با DNA الگو در دمای 37Ċ اتصال برقرار می سازد. تنوع الگوهای باندهی RAPD به سبب حضور و یا عدم حضور یک باند حاصله از تنوع در مکانهای باندینگ پرایمر است. محدودیت عمده این روش عدم تکرار پذیری آن به سبب دمای پایین اتصال است. اما، راندمان یک مارکر مطلوب RAPD می تواند

بواسطه توالی یابی پایانه آن و طراحی پرایمرهای بلندتر (بعنوان مثال ۲٤ نوکلوتید) برای تکثیر اختصاصی مارکرها افزایش یابد. اینچنین نواحی تکثیر یافته با توالی شناخته شده(SCARs) از نظر ساختار و کاربرد، مشابه مکانهای با توالی نشاندار(STS) می باشند.

۳- CAPS

توالیهای پلی مورف توسعه یافته منشعب (CAPS)، برپایه تنوع مکان برش آنزیم در قطعات DNA تولید شده بوسیله PCR، می باشند. منبع اطلاعات توالی برای پرایمرها می تواند یک بانک ژن، کلونهای cDNA یا ژنومی یا باندهای RAPD کلون شده بدست آید. این مارکر همبارز است.

٤- SSR

تکرارهای توالی ساده یا ریز ماهواره ها (میکروستلایت ها) در یوکاریوتها حاضر هستند. پلی مرفیسم SSR تنوع در تعداد واحدهای تکراری در یک ناحیه مشخص از ژنوم را مشخص می کند. تناوب تکرارهای بزرگتر از 20 bp تخمین زده می شود که هر 33 kb در گیاهان رخ می دهند. توالی نوکلئوتیدی در بر گیرنده تکرار، برای طراحی پرایمرها بمنظور تکثیر تعداد متفاوتی از واحدهای تکراری در واریته های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. این پرایمرها برای تعیین سریع و دقیق لوکوس های پلی مورف مطلوب بوده و اطلاعات حاصله می توانند برای توسعه یک نقشه فیزیکی برپایه این تگهای توالی مورد استفاده قرار گیرند. این نوع از پلی مورفیسم بسیار تکرار پذیر است.

٥- AFLP

مارکرهای پلی مرفیسم طولی قطعه تکثیر شده (AFLP)، بوسیله تکثیر قطعات DNAحاصله از هضم آنزیم برشی تولید شده اند. DNA با وزن مولکولی بالا بوسیله دو آنزیم برشی هضم می شود: یک شش باز بر (برای مثال EcoRI) و یک چهار باز بر (برای مثال Mse I). مولکولهای آداپتور به انتهای

قطعات DNA می چسبند. دو پرایمر دارنده توالی مکمل با آداپتور بعلاوه تعداد کمی نوکلئوتید اضافی تصادفی در انتهای 3¢ آنها، برای تکثیر انتخابی قطعات با استفاده از PCR مورد استفاده قرار می گیرند. محصولات تکثیر شده در ژلهای توالی یابی یا حتی PAGE معمولی جداشده و بوسیله رنگ زدایی نقره قابل مشاهده می باشند. در طرف دیگر، پرایمرها بوسیله رادیوایزوتوپ یا رنگ فلورسانت لیبل گذاری می شوند بنابراین باند AFLP می تواند بوسیله اتورادیوگرافی یا بوسیله استفاده از آنالیز تصویر بدست آید. بالاترین تعداد محصولات تکثیری (۵۰ تا ۱۰۰) در میان سیستمهای باند دهی DNA، در AFLP تولید می شود.این امر احتمال شناسایی پلی مرفیسم بسیاری از ساختار ها را افزایش می دهد. در حال حاضر این تکنیک طولانی تر و گرانتر از سایر روشهای مبتنی بر PCR است. این روش نیازمندDNA با کیفیت بالا برای اطمینان از هضم کامل بوسیله آنزیمهاست. هضم ناقص DNAموجبب ایجاد تنوع غیرتکرار شونده در باندهای DNA می شود.

SNP-٦

مارکرهای مولکولی، وقتی تنوع توالی میان افراد مورد مطالعه مشاهده می شود، پلی مورف هستند. مارکرهای مولکولی بنابراین به سادگی شاخصی از پلی مرفیسم توالی هستند. پلی مورفیسم توالی میان اشخاص می تواند به شکلهای مختلفی رخ دهد، برای مثال، می تواند به سبب ورود یا حذف بازهای چندگانه باشد، یا می تواند به سبب پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) باشد. ورودها، حذفها و SNPs در تعیین تنوع توالی میان اشخاص مهم هستند. SNPs در ژنومهای گیاهی فراوان هستند. آنها برای ژنوتایپینگ جمعیت های انسانی برای بعضی بیماریهای ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته اند. هزینه توسعه SNPs بسیار بالاست، چرا که برای هر لوکوسDNA باید توالی یابی شده و پرایمرهای PCR مناسب طراحی شوند. پرایمرها باید سپس برای تکثیر قطعه متناظر دیگر ژنوتیپ های ممکن مورد استفاده قرار گیرند. این قطعات باید سپس توالی یابی شده و توالی ها برای تعیین SNPs هر

هالوتایپ مورد مقایسه قرار گیرند. واژه "هالوتایپ" در مورد SNPs بجای واژه "آلل" بکار برده می شود. روشهای شناساییSNPs در درون یک لوکوس ژنتیکی تحت عنوان توالی یابی مستقیم شناخته شده و شامل: پلی مرفیسم تک رشته(SSCP) ، گسستگی شیمیایی جفت شدنهای ناموفق (CCM)و گسستگی جفت شدنهای ناموفق آنزیمی (EMC) می باشند.

نقشه یابی مولکولی ژنهای مهم کشاورزی

در گذشته، تعیین نقشه های لینکاژ ژنتیکی با استفاده از مارکرهای مورفولوژیکی، در اغلب گیاهان زراعی، به سبب عدم تعداد کافی مارکرهای مولکولی، قابل انجام نبود. تعیین نقشه نیازمند نیروی کار بسیار، صرف سالها زمان و جمعیتهای مختلف نقشه یابی بود چرا که همه مارکرهای مورفولوژیکی نمی توانند در یک تلاقی منفرد بدست آیند. این نقشه ها حامل تعداد معدودی از مارکرها بوده و بنابراین نمی توانستند برای نقشه یابی موثر ژنهای هدف بکار برده شوند. با دسترسی به تعداد زیادی مارکرهای مولکولی، مانند RFLP, RAPD, AFLP، میکروساتلایت ها، نقشه یابی کامل ژنومهای گیاهی واقعیت یافت. نقشه های ژنوم مولکولی در تقریبا تمام گیاهان زراعی ایجاد شده اند. تعداد مارکرهای مورد استفاده برای تعیین این نقشه ها و تراکم مارکر تنوع زیادی دارند. بیشتر این نقشه ها برپایه مارکرهایRFLP هستند. کارهای نقشه یابی فعلی عمدتا شامل مارکرهای مبتنی برPCR مانند AFLP, STMS, RAPD, CAPS, SCAR وSTS هستند. درمیان گیاهان زراعی، نقشه ژنوم برنج بیش از همه تکمیل شده است. نقشه گزارش شده توسط Harushima et al. حاوی بیشترین تعداد مارکرهاست (۲۲۷۵). قابل توجه اینکه این نقشه با استفاده از یک جمعیت منفردF2 تهیه شد. اخیرا، این نقشه بوسیله ترکیب آن با نتایج حاصل از مارکرهای اضافیSTS و STMS تکمیل تر شده است. در بیشتر گیاهان زراعی، جمعیت F2 به سبب اینکه می تواند در کوتاهترین زمان ممکن و با کمترین تلاش تولید شود، مورد استفاده قرار می گیرد. اما، برای نقشه یابی ژنها، بخصوص ژنهای صفات کمی، نقشه یابی دائمی جمعیت هایی مانند لاین های اینبرد

نوترکیب (RILs) و دابلد هاپلوییید ها مورد ترجیح است چرا که آنها می توانند در طی سالها توسط خودگشنی و تکثیر در طی مکانها و فصول مختلف مدیریت شوند.

دسترسی به مارکرهای مولکولی و نقشه های لینکاژی کامل، نقشه یابی ژنهای مسئول صفات کمی و همچنین کیفی را میسر ساخته است. صفات کیفی که بوسیله یک ژن کنترل می شوند الگوی مندلی ساده توارث پذیری تک ژنی مانند ژنهای کنترل کننده استرس های زنده، رنگ میوه درهلو، رنگ دانه در ذرت، رنگ گل در اطلسی را نشان می دهند. نقشه یابی چنین ژنهایی با مارکرهای مولکولی مختلف در **جدول یک** نشان داده شده اند. صفات کمی مانند عملکرد، تحمل به خشکی و سرما، تراکم چوب که تنوع پیوسته را نشان می دهند بوسیله ژنهای بسیاری کنترل می شوند. ژنهای مشخص کنترل کننده بیان صفات کمی هم اکنون تحت عنوان لوکوس های صفت کمی (QTL) نامیده می شوند. QTL با اثرات نسبی قوی اهداف خوبی برای گزینش به کمک مارکر هستند بخصوص اگر اندازه گیری صفت مشکل است. بسیاری ازQTL اثرات کوچک نسبی دارند. نقشه یابی دقیق این QTL دشوار است بخصوص با توجه به اندازه استاندارد جمعیت درعمده مطالعات نقشه یابی. بنابراین، حالا اندازه جمعیت برای نقشه یابی به حدود ۳۰۰ الی ۵۰۰ فرد افزایش یافته است. اما، بمنظور درک دقیق عملکرد ژن و چگونگی برهمکنش آن با دیگر ژنها، آگاهی از محل ژنها در درون ژنوم و آگاهی از ارتباط آن با دیگر ژنهای مورد علاقه مفید است. تعداد QTL کنترل کننده یک ژن از یک تا بیش از ده برای گیاهان زراعی مختلف گزارش شده است. پیشرفتها در امر نقشه یابی ژنهای مهم زراعی در برخی گیاهان عمده، متعاقبا مورد اشاره قرار می گیرد.

۱- برنج

تاکنون تعداد زیادی از ژنهای کنترل کننده صفات کمی شامل مقاومت به بیماری، مقاومت به حشره، کیفیت پخت، مقاومت به خشکی و شرایط غرقابی با استفاده از مارکرهای نقشه یابی (مپینگ) شده اند. نقشه یابی

ژنهای مقاومت به بیماری، هدف عمده برای تولید پایدار برنج است. مثالهای کمی از نقشه یابی چنین ژنهایی با استفاده از مارکرهای مولکولی در اینجا توضیح داده می شود. برای مثال، مارکرهای RFLP برای نقشه یابی ژن مقاومت به پشه گال زا، *Gm2*، با استفاده از لاینهای اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی میان Phalguna (واریته مقاوم) و ARC6650 (رقم بومی حساس) قابل ذکر هستند. دیگر ژن مقاومت به پشه گال زا، *Gm4t* ، که با *Gm2*غیر آللی است از نظر اعطای مقاومت در مقابل بیوتایپ های ۱، ۲، ۳ و ٤ مشهور است و با استفاده از RAPDدر ترکیب با آنالیز افتراقی بالک یک جمعیتF3 برچسب گذاری شده است. برخی از آنالوگهای ژن مقاومت (RGAs) مقبول، کلون و توالی یابی گردیده و مشخص شده که آنها به میزان زیادی با ژنهای شناخته شده مقاومت به بیماری لینکاژ دارند. نقشه یابی ژنتیکی مقاومت به ویروس تانگروی کروی برنج (RTSV) و زنجره سبز (GLH) درARC11554 با استفاده از مارکرهای RAPD و RFLP انجام شده است. لوکوس عمده *Pi-2(t)*برای مقاومت به بلاست ناشی از قارچ *Magnaportha grisea*، با استفاده از مارکرهای RFLP نقشه یابی شده است. برخی از ژنهای اصلی برای مقاومت به پاتوژن بلایت برگی باکتریایی(BLB) ، با مارکرهای RFLP یا RAPD برچسب زنی (نشاندار) شده اند. دو مارکر میکرو ستلایت به شدت پیوسته با BLB در فاصله 2 و 18 cMلوکوس *xa5* یافت شده اند. برچسب گذاری RFLP یک ژن برای مقاومت به زنجره قهوه ای BPH گزارش شده است.

با استفاده از مارکرهای RFLP، ژنهای تحمل به شناور بودن، تحمل به نمک، جذب فسفرو تحمل به آلومینیوم تاکنون نقشه یابی شده اند. گزارشهای مختلفی در مورد نقشه یابی ژنهای نرعقیمی و بازگرداننده باروری با استفاده از مارکرهای RFLP در دسترس هستند. مشابها، ژنهای صفاتی چون عطر دانه، قد کشیدن دانه پخته شده با استفاده از مارکرهای RFLP نقشه یابی شده اند. اخیرا، لوکوس های صفت کمی عملکرد با استفاده از مارکرهای SSR و STS نقشه یابی شده اند.

۲- گندم

گزارشات مختلف در مورد نقشه یابی ژن‌های مقاومت به حشرات و بیماری‌ها، تنش‌های غیر زنده، کیفیت دانه و دیگر صفات در **جدول یک** فهرست شده‌اند. زنگ گندم از موضوعات اساسی است که نتایج بسیار موفقیت آمیزی در مورد نقشه یابی ژن آن تاکنون گزارش شده است. یک مارکر جایگاه با توالی نشاندار(STS) پیوسته به *Lr28*، ژن مقاومت به زنگ برگ، بوسیله آنالیزRAPD لاین های تقریباً ایزوژن (NILs)، در هشت بک‌گراند مختلف شناسایی شده است. از ۸۰ پرایمر تست شده، یک مارکر رپید قادر به تفکیک NILs و والد اهدایی از والد دوره‌ای حساس بود. مقایسات میان NILs و والدین دوره‌ای شان برای شناسایی مارکرهای مولکولی پیوسته با ژنهای نشانگر مقاومت به پاتوژن ها، مفید بود. توسعه مارکرهای تکرار توالی بین ریزماهواره ای ساده (ISSR primers)، برای ژنهای مقاومت به زنگ ساقه(*SR39*) و زنگ برگ(*Lr 35*)، انتقال این ژنها به لاینهای الیت گندم را تسهیل کرده است. مارکرهای ریز ماهواره برای شناسایی پلی مورفیسم DNA در مجموعه های مقاوم به زنگ زرد بکار گرفته شده اند. نه مارکر ریز ماهواره پیوسته با ژن مقاومت به زنگ نواری،YrH52، شناسایی شده اند. مارکرهای ریزماهواره برای برچسب زنی ژنهای مختلف یاQTL، شامل ژنهای *Rht8*،*Rht12* و*Vrn1*و QGpc.ccsu.2D.1 یک QTL درصد پروتئین دانه، بکار گرفته شده اند. مشکل جوانه زنی پیش از برداشت، بخصوص در دانه های کهربایی، در عمده مناطق رشد گندم در جهان ، از جمله هند، معمول است. بهبود درصد پروتئین دانه و ترکیب آن در گندم نان کاری مشکل و بعنوان دلمشغولی عمده اصلاحگران نبات باقی مانده است. QTL های تحمل به پیش جوانه زنی و درصد پروتئین دانه با استفاده از مارکرهای مکانهای چندگانه با توالی نشاندار (STMS) و مکانهای با توالی نشاندار(STS)، برچسب زنی شده اند.

۳- کلزا

Brassica juncea (خردل هندی یا خردل قهوه ای)، *B. rapa* (شلغم روغنی) و *B. napus* (کلزا) عمده *Brassica*های دانه روغنی هستند. در این گروه از محصولات، مارکرهای مولکولی برای نقشه یابی ژنهای بنیادین برای مقاومت به بیماری و کیفیت روغن و خوراک بکار گرفته می شوند. تلاشهای مختلفی برای شناسایی مارکرهای مقاومت به زنگ سفید، حاصل از قارچ *Albugo candida*، یک بیماری مخرب و با شیوع گسترده در این محصولات که عملکرد را به میزان ۶۰-۳۰ درصد در مزارع بشدت آلوده کاهش می دهد، انجام شده است. یک لوکوس (*ACA1*)کنترل کننده مقاومت به *A. candida* در *B. napus* با استفاده از مارکرهای*A. candida* نقشه یابی شده است. یک لوکوس منفرد کنترل کننده مقاومت به*AC2* در *B. rapa* با استفاده از مارکرهای RFLP و یک جمعیت در حال تفرق از تلاقی میان *Per* (مقاوم به *AC2* and *AC7*) و 'R500' (حساس) نقشه یابی شده است. یک مارکر RFLP هم افتراقی (X140a)و دو مارکر RFLP بشدت پیوسته(X42 و X83) که برای MAS و نقشه یابی برپایه کلونینگ ژن منفرد (*Acr*)مسئول اعطای مقاومت به *A. candida* در *B. juncea*، *مفید می باشند* شناسایی شده اند. نقشه یابی ژن مقاومت(*Ac2t*) در*B. juncea* *حاصل* از یک منبع روسی مقاوم در برابر ایزوله کانادایی بسیار قدرتمند *A. candida* انجام شده است. مجموعهBEC-144 *(B. juncea)* حاصل از لهستان، نشان دهنده مقاومت به ایزوله های هندی پاتوژن زنگ سفید بوده است. شناسایی دو مارکر پیوسته در فازهای جفت و ناجفت احاطه کننده ژن کنترل گر مقاومت به *A. candida* در BEC-144 گزارش شده است. این کار بعدها با توسعه مارکرهای AFLP و CAPS برای این ژن، گسترش بیشتری یافت. علاوه بر این معتبر بودن مارکر CAPS در جمعیت های متفاوت، بیانگر سودمند بودن آن در امرگزینش به کمک مارکر است. نقشه یابی ژنهای مقاومت به زنگ سفید در*B. rapa* با استفاده از جمعیت های نوترکیب اینبرد و یک نقشه پیوستگی ژنتیکی شامل ۱۴۴ مارکرRFLP و سه مارکر فنوتیپی انجام شده است. مارکرهای

مولکولی ژنهای مقاومت به *Leptosphaeria maculans* در *B. napus* ، بوسیله تحقیقات مختلف ایجاد شده اند. لوکوس مقاومت*LmFr1* با مارکرهایcDNA 011 و cDNA 110 پیوسته بوده و در درون گروه لینکاژی ۶ (LG6) جای گرفته است. لوکوس های pb-3 و pb-4 مقاومت به*Plasmodiophora brassicae* در *B. oleracea* شناسایی شده و به مارکرهای RFLPو AFLP پیوسته بوده اند. مشابها، مارکرهای 14a درLG1 ، مارکر 48 در LG4 و مارکر 177b درLG9 با ژن مقاومت به تورم ریشه *Plasmodiophora brassicae*(نژاد ۷) در *B. oleracea* پیوسته بوده اند.

آزمایشاتی برای تولید مارکرهایی برای اسیدهای چرب مانند اسید لینولئیک، اسید لینولنیک، اسید الئیک، اسید پالمتیک و اسید اروسیک انجام گرفته است. دو مارکرRAPD، K-011100 و 25a با غلظت اسید لینولئیک پیوسته اند. مارکرهای رپید پیوسته با اسیدهای الئیک، لینولئیک و لینولنیک در *B. napus* شناسایی شده اند. مارکر رپید پیوسته با درصد اسید لینولنیک به یک مارکر همبارز SCAR تبدیل شده است. مارکرهای پیوسته با مناطق ژنومی کنترل کننده غلظت اسید لینولنیک در *B. napus* متناظر با ژن *fad3* (omega-3-desaturase) در *A. thaliana*، یافت شده اند. در مطالعه ای دیگر، یک QTL منفرد حامل شش مارکر مرتبط با درصد اسید لینولئیک، پالمتیک و الئیک در *B. rapa* شناخته شده است. اخیرا دوQTL اصلی تاثیرگذار بر میزان اسید الئیک در*B. juncea* با استفاده از هر دو آنالیز فاکتور منفرد واریانس و نقشه یابی منقطع، نقشه یابی شده اند. لوکوس های اسید اروسیک با مارکرهای مولکولی بواسطه استفاده از آنالیزRFLP یا BSA در*B. napus* پیوسته بوده اند. در هر دو تحقیق، دو QTL شناسایی شدند. این QTL ها در6 LG و LG12 یا درLG7 و LG15 جای گرفته اند. در یک مطالعه مستقل، دو QTL مرتبط با میزان اسید اروسیک در *B. napus* شناخته شده و در دو لوکوس متفاوت، E1 و E2 ، نقشه یابی شدند. QTL های E1 و E2 متناظر با دو آلل b-ketoacyl-synthase

(KCS)حاصل از *B. campestris* و *B. oleracea* ، دو گونه والدی *B. napus* بوده وپروتئین طویل ساز اسید چرب یک *(Fae1)* را کد می کنند. در *B. rapa* لوکوس های اسید اروسیک با مارکرهای RFLP پیوسته بودند.

ژن رنگ پوسته بذر با مارکرهای متنوع RFLP و RAPD برچسب گذاری شده است. مارکرهای RFLP پیوسته با رنگ پوسته بذر در*B. napus* با استفاده از روش آنالیز افتراقی بالک (BSA) شناسایی شده اند. صفت رنگ پوسته بذر در *B. campestris* با مارکرهای رپید با استفاده از لاینهای اضافی*B. campestris-oleracea* برچسب گذاری شد. نسبت سه به یک تفرق رنگ قهوه ای دانه به زرد در *B. rapa* بیانگر کنترل تک ژنی این صفت بوده ودرLG5 نقشه یابی شد. مطالعه تفرق صفت در جمعیتF2 گونه *B. juncea* بیانگر افزایش عملکرد ژن غالب به نسبت فنوتیپی ۱۵ به یک بود. دو مارکرRFLP در برگیرنده یک لوکوس شناخته شده اند. در یک گزارش جدید، صفت رنگ پوسته بذر با استفاده از یک روش ترکیبیBSA و AFLP در *B. juncea* برچسب گذاری شده است.

۴- سویا

در سویا، تاکید بر نقشه یابی ژنتیکی ژنهای مقاومت به بیماریها و آفات می باشد. علاوه بر آنها، صفات کمی مانند کیفیت روغن، ارتفاع گیاه، عملکرد جوانه با استفاده از نقشه های مولکولی مشخص شده اند. نماتد سیست سویا (*Heterodera glycines*Inchinoe) (SCN) عمده ترین آفت سویا از نظر آسیب اقتصادی است. گزارش شده که دو مارکرSSRبه اسامی BARC-Satt 309 وBARC-Satt 168 در فاصله 0.4 cM از *rhg1*تفکیک و نقشه یابی شده اند. وقتی این مارکرها برای ارزیابی لاینهای حاصل از تلاقی والدین حساس و مقاوم به SCN استفاده شدند، راندمان بالای آنها در تفکیک لاینهای حامل ژن

مقاومت *rhg1* از لاینهای حامل آلل حساسیت به SCN در لوکوس *rhg1* ثابت شد. در مطالعه ای دیگر، مقاومت زراعی به نژادسه SCN در کولتیوار Forrest مشروط به دوQTL دانسته شد. ژنهای دست اندرکار گمان می رود که شامل*rhg1* در گروه لینکاژی Gو *rgh4* در گروه لینکاژی A2 هستند. نقشه ای حجیم برای فواصل حامل *rhg1* و *rhg4* با استفاده از مارکرهای AFLP آماده شده است. یک آنالیز ۱۲ طرفه واریانس، دو لوکوس کنترل کننده مقاومت به SCN در تلاقی Essex × Forrest را نشان داد. با استفاده از ۱۳۹RFLPs، QTL های مرتبط با مقاومت به کرم طوقه ذرت (*Helicoverpa zea*Boddie) شناخته شده اند. با کمکAFLP، چهار مارکر بشدت پیوسته با ژن مقاومت به ویروس موزائیک سویا ،*Rsv1* ، نقشه یابی شده اند، بنابراین سودمندی نقشه یابی ژنتیکی برای تولید مارکرهای بشدت پیوسته به ژنهای مقاومت به بیماریهای مهم نشان داده می شود. سندرم مرگ سویا (SDS) ایجاد شده بوسیله *Fusarium solani* f. sp. *glycines* کاهش شدید عملکرد را سبب می شود. دو QTL برای مقاومت به SDS در cv. Pyramid با استفاده از مارکرهای SSR ، BARC-Satt 163 و BARC-Satt 080، نقشه یابی شده اند. مشابها، یکQTL از cv. Douglas با استفاده از مارکر BARC-Satt 307(SSR)، شناسایی شد. پیشنهاد شده که هرمی کردن ژن می تواند روش موثری برای توسعه ارقام با مقاومت پایدار به SDS باشد.

افزایش درصد اسید استئاریک برای بهبود کیفیت روغن سویا یک هدف اصلاحی مطلوب برای مقاصد فرآو ری غذایی است. سه مارکرSSR ، Satt 070 ، Satt 474 و Satt 556مرتبط با درصد اسید استئاریک شناسایی شده اند. شناسایی این مارکرها ممکن است در برنامه های اصلاحی برچسب زنی متکی بر مارکر مولکولی، تغییرات اسیدهای چرب سویا مفید باشند. مارکرهای RFLP برای شناسایی QTL های مرتبط با ارتفاع، استقرار و بلوغ گیاه بکار رفته اند. لوکوس عمده مرتبط با ارتفاع گیاه، *Dt1*، در LG L شناسایی شده است.*Dt1* همچنین با استقرار مرتبط است. علاوه بر این، با کمک

مارکرهای RFLP ، دوQTL برای ارتفاع گیاه(K007 بر LG H و A516b برLG N) و یک QTL برای استقرار (cr517 برLG J) شناسایی شده اند. برای بلوغ، QTLs مستقل در فواصل میانR051 و N100 ، و میان B032 و CpTI بر LG K شناسایی شدند. مارکرهای RFLPبرای شناسایی QTLs مرتبط با صفات جوانه زنی سویا شناسایی شدند. چهارQTL مرتبط با عملکرد - جوانه زنی در آنالیز مرکب انجام گرفته به مدت دو سال یافت شدند. یافت شد که QTLs تعدیل کننده عملکرد جوانه در همان مکانهای ژنومی که QTLs وزن دانه قرار داشتند، حضور دارند. این داده ها، نشان می دهند که MAS می تواند برای افزایش عمکرد – جوانه سویا مفید باشد.

۵- نخود فرنگی

بیماری پوسیدگی ریشه قارچی ایجاد شده بوسیله*Aphanomyces euteiches* ، مهمترین بیماری نخود فرنگی در سراسر جهان است. هیچ ماده شیمایی مناسبی برای کنترل پاتوژن در دسترس نیست. بنابراین، برای تسهیل اصلاح مقاومت به این بیماری و فهم بهتر توارث پذیری مقاومت جزئی، QTLs مرتبط با این بیماری با استفاده از مارکرهای AFLPs،RFLPs، SSRs، ISSRs و STS شناسایی شده اند. نقشه ژنتیکی حاصل، شامل ۳۲۴ مارکر پیوسته توزیع شده در طی ۱۳ گروه لینکاژی با طول 1.094 cM است. مجموعا هفت ناحیه ژنومی با مقاومت بهبیماری قارچی پوسیدگی ریشه مرتبط بودند. اولی بعنوان*Aph1* نامیده شد که بعنوان یک QTL اصلی شناخته شد. دوQTL اختصاصی دیگر،*Aph2* و *Aph3* ، نزدیک ژنهای *r* (بذور صاف/چروکیده) و *af* (برگهای افیلای نرمال) نقشه یابی شدند. چهار QTL کوچک دیگر شناسایی شدند. آللهای مقاومت *Aph3* و دوQTL کوچک از والد حساس بدست آمده اند. مارکرهای RAPD و SACR پیوسته با ژنهای اثر گذار بر ساختار گیاه، سه ژن (*rms2*،*rms3* و*rms4*)و دو ژن مسئول پاسخ گلدهی به فتوپریود (*sn* و*dne*)، گزارش شده اند. در

مطالعه ای دیگر، QTL های اثرگذار بر وزن دانه با استفاده از مارکرهای RFLP نقشه یابی شده اند. چهارQTL در فواصل مارکری در سه گروه لینکاژی مختلف شناسایی شده اند.

۶- نخود

بلایت یک بیماری مهم نخود ازنظرخسارت اقتصادی است که توسط قارچ*rabieiAscochyta* تولید می شود. یک لوکوس اصلی (*ar1*) مقاومت به پاتوتایپ I این بیماری و دو لوکوس اصلی مغلوب مستقل (*ar2a*) با اثر مکمل ژن مقاومت به پاتوتایپ II، با استفاده از SSRs شناسایی شده اند. در مطالعه دیگری، اجتماع مارکرهای همبارز STMS نقشه یابی مقاومت به ascochyta در نخود را بهبود بخشیده است. آنالوگهای ژن مقاومت(RGAs) *Cicer* بوسیله روشهای مختلفPCR ایزوله شده و در تلاقی بین گونه ای والدین مقاوم و حساس به پوسیدگی فوزاریومی، بوسیله مارکرهای RFLP و CAPS نقشه یابی شده اند. مجموعا سیزده RGAs مختلف ایزوله شده و در ۹ گروه مجزا قرار گرفتند. این مطالعه نقطه آغازی برای شناسایی و نقشه یابی ژنتیکی ژنهای کاندید مقاومت در *Cicer*که برای MAS مفید هستند و منبعی برای ژنهای مقاومت *Cicer* را ارائه می کنند، می باشد.

۷- گوجه فرنگی

گوجه فرنگی یک سبزی مهم است و کار زیادی در مورد نقشه یابی ژنتیکی ژنهای مهم زراعی در این گیاه انجام شده است. بیماری بلایت اولیه (EB)، حاصل از قارچ مخرب *Alternaria solani* Sorauer، سبب برگ ریزی گیاه، کاهش عملکرد و کیفیت میوه، و تلفات معنی دار گیاه می شود. نقشه یابی QTL با استفاده از ۱۴ مارکر RFLP و بیست و سه RGAs، سبب شناسایی ده QTL مهم برای EB شده است. ویروس سیب زمینیY (PVY) یک بیماری مهم ارگانیسمی است که بر عملکرد سیب زمینی اثر می گذارد. مقاومت علیه PVY در خویشاوند وحشی سیب زمینی، *Lycopersicon*

*hirsutum*PI247087 شناسایی شده است. لوکوس *pot-1* با استفاده از مارکرهای AFLP بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۳، در مجاورت لوکوس مغلوب *py-1*، عامل مقاومت به پوسیدگی ریشه چوب پنبه ای، نقشه یابی شده است. دیگر پاتوژن مهم، ژن مقاومت به ویروس موزائیک کدو(CMV)، *Cmr*، با استفاده از مارکرهای RFLPو isozyme در*L. chilense* نقشه یابی شده و آن بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارد. مارکرهای کروموزوم ۱۲بطور معنی داری با مقاومت به CMV در هر دو مدل کمی و کیفی توارث مرتبط هستند. دانستن نقشه مکان *Cmr* باید اینتروگروسیون بوسیله MAS را تسریع نماید.

شناسایی مارکرهای به شدت پیوسته با ژنهای مهم، ایزولاسیون ژنها از گوجه فرنگی را تسهیل می کند. برای مثال، استراتژی کلونینگ بر پایه نقشه، برای ایزوله کردن ژن مقاومت به نماتد گره ریشه، *Mi*، با استفاده از مارکرهای پیرامونی متکی بر PCR طراحی شده است. نقشه یابی ساختار ظریف نوترکیب های حاصل از زیرکلونهای کاسمید نقشه یابی شده بوسیله مارکرهای جدیدا توسعه یافته AFLP و RFLP، *Mi* را در یک ناحیه ژنومی حدود 550 kb موقعیت یابی کرد. دو موتاسیون مغلوب در گوجه فرنگی یافت شدند که تشکیل گل و مناطق جدایی پایک میوه را کاملا مانع می شوند، بعبارت دیگر ژنهای عدم اتصال(*j*) و عدم اتصال ۲(*j-2*) . هر دو ژن، بطور غیر قطعی بر کروموزوم شماره ۱۱ با فاصله 30 cM مکان یابی شده بودند. اما، مارکرهای رپید و RFLP در شناسایی و نقشه یابی دقیق لوکوس *j-2* بر کروموزوم ۱۲بجای کروموزوم۱۱ که امکان کلونینگ این ژن برپایه نقشه را میسر می سازد، کمک کردند.

بهبود کیفیت حسی (ارگانولپتیک) مهم است اما هدف پیچیده ای برای تجارت گوجه تازه است. مجموعا ۲۶ صفت موثر بر تنوع کیفیت حسی ارزیابی شده اند. صفات فیزیکی شامل وزن، قطر، رنگ، استحکام و انعطاف پذیری میوه هستند. صفات فیزیکی شامل وزن ماده خشک، میزان اسیدیته و درصد جامدات حل

پذیر، قندها، لیکوپن، کاروتن و ۱۲ ماده فرار معطر است. مجموعا ۸۱ QTL مهم برای ۲۶ صفت با استفاده از مارکرهای DNAشناسایی شده اند. نقشه یابی RFLP حدود ۳۲ لوکوس مستقل متناظر با ژنهای مشهور از نظر اثر بر رسیدن میوه و/ یا پاسخ اتیلن گزارش شده است. تعیین مکان لوکوس های رسیدن و پاسخ به اتیلن در نقشهRFLP گوجه، شناسایی توالی ژنی کاندید متناظر با ژن منفرد شناخته شده و تعیین نقش QTL بر توسعه میوه و پاسخ به اتیلن را تسهیل می کند.

۸- سیب زمینی

در سبزیجاتی مانند سیب زمینی، نقشه یابی ژنتیکی اساسا در مورد مقاومت به بیماری انجام می شود. *Phytophthora infestans* یک قارچ بسیار مخرب ایجاد کننده بلایت دیررس است. یازده آلل مقاومت (R1-R11) شناسایی شده اند که مقاومت اختصاصی نژاد به این قارچ را سبب می شوند. در دو گزارش، آللهای R6 و R7، مشابه آلل R3 ، بوسیله مارکرهای RFLP بر کروموزوم XI نقشه یابی شده و آلل R2 با استفاده ازمارکر AFLPنقشه یابی شد. مطالعه نقشه یابی ژن مقاومت به نماتد گره ریشه (*Meloidogyne chitwoodi*) حاصل از*Solanum bulbocastanum* در یک جمعیت BC2 با استفاده از مارکرهای RFLP انجام شده است. نقشه یابی RFLP برای مقاومت به ویروس X سیب زمینی که توسط ژن منفرد، *Nxphu*، کنترل می شود انجام شده است. چهار مارکر RFLP،CT220، TG328، CT112 و TG424 از بازوی بلند کروموزم IX که با فنوتیپ فوق حساسیت پیوسته بودند گزارش شده اند. نقشه یابی QTL برای مقاومت به نماتد سیست سیب زمینی (*Globodera rostochiensis*) بوسیله محققین مختلف گزارش شده است. در یک مطالعه، لوکوس مقاومت به نماتد، *Gpa2*، با استفاده از ۷۳۳ مارکرAFLP، بر کروموزوم ۱۲ نقشه یابی شد. این مطالعه همچنین نشان داد که *Gpa2* با لوکوس*Rx1* که مقاومت به ویروس X سیب زمینی را سبب می شود پیوسته است. نقشه های پیوستگی با استفاده از مارکرهای AFLP و RFLP تهیه شده و برای

تعیین سه QTL واقع بر کروموزومهای VI،V و XII ، برای مقاومت بر علیه نماتد سیست استفاده شده اند. در یک مطالعه جدید، ۹ هومولوگ ژن مقاومت(RGHs) در دو کلون دیپلویید سیب زمینی با یک جفت پرایمر اختصاصی بر پایه موتیف های حفاظت شده در دامنه LRR ژن مقاومت به نماتد سیست*Gpa2* و ژن مقاومت به ویروس*Rx1*،X ، شناسایی شده اند. مارکرAFLP برای تسهیل نقشه یابی ژنی RGHs در چهار هاپلوتایپ تحت مطالعه استفاده شده است.

۹- نیشکر

نیشکر یک گیاه صنعتی مهم بمنظور آنالیز توارث پذیری صفات کمی است. مطالعه زیادی در مورد نقشه یابی آلل صفت کمی(QTA) انجام شده است. نخستین نقشه یابی گستردهQTL بر روی جمعیتی از ۲۹۵ نتاج حاصل از خودگشنی رقم R570 با استفاده از هزار مارکرAFLP انجام شده است. جمعیت در یک الگوی تکرار دار از نظر چهار جزء اساسی عملکرد، ارتفاع گیاه، تعداد ساقه، قطر ساقه و بریکس، در دو چرخه متوالی محصول ارزیابی شد. چهل QTA مفروض برای چهار صفت از پنج صفت ظاهر شده در طی هر دو سال یافت شدند. در مطالعه ای دیگر، نقشه یابی QTLs برای عملکرد قند و صفات وابسته،pol، وزن ساقه، تعداد ساقه، درصد فیبر و درصد خاکستر با استفاده از ۷۳۲ مارکر DNAانجام شد. پنجاه QTL از ۶۱ QTL در ۱۲ ناحیه ژنومی هفت گروه همولوگ نیشکر کلاستر بندی شدند.

۱۰- درختان جنگلی

مارکرهای مولکولی بطور موفقیت آمیزی در درختان جنگلی بکار گرفته شده و در برنامه های اصلاحی موجود بصورت سودمند و اقتصادی سهم دارند. در درخت کاج استخری، مجموعه های صفت- مارکر برای اجزای پروفایل های تراکم چوب شعاعی شناخته شده و جمعیت های متنوعی برای تایید این مجموعه ها ایجاد شده اند. مارکرهای رپید برای نقشه یابی ژنوم و لوکوس های صفت کمی کنترل کننده رشد اولیه

یک درخت کاج هیبرید F1(*Pinus palustris* Mill. × *P. elliottii* Engl.) و یک درخت کاج اسلش (*P. elliottii*Engl.) بعنوان والد دوره ای در یک خانوادهBC1 حاصل از (نتاج تلاقی کاج برگ دراز با کاج اسلش) × کاج اسلش شامل ۲۵۸ فرد بکار گرفته شده اند. با کمک مارکرهایRFLP، سیزده QTL مختلف افزایش طول و افزایش قطر در کاج استخری شناخته شدند. متشابها، صفات مرتبط به خصوصیات شیمیایی چوب برای حضور در یک شجره حاصل از سه نسل outbred (اصلاح حاصل از تلاقی والدین نامشابه) کاج استخری(*Pinus taeda* L.) ، با استفاده از مارکرهای DNA آنالیز شدند. نقشه یابی چند مارکری لوکوس های تراکم چوب در یک شجره outbred کاج شعاعی با استفاده از مارکرهایDNA گزارش شده است. اثر مکانهای QTL بطور معنی داری با بیان ژن تراکم چوب در سن های متفاوت مرتبط است. این نتایج کاربرد اطلاعات مارکر برای گزینش زودهنگام بمنظور افزایش تراکم چوب جوان را تشویق می کنند.

ژن غالب منفرد (*R*) عامل مقاومت به زنگ سفید آبله ای کاج (*Cronartium ribicola*Fisch.) در*Pinus lambertiana* Dougl ، با استفاده از مارکرهای رپید نقشه یابی شده است. سیزده لوکوس رپید شناسایی شده اند که به *R* پیوسته هستند. این امر می تواند در آزمایشات نقشه یابی با وضوح بالا برای تعیین مارکرهای بسیار پیوسته برای تسهیل کلونینگ احتمالی *R* کمک کند.

مارکرهای رپید برای تعیین محل ژنتیکی و اثرات مناطق ژنومی کنترل کننده تراکم چوب، رشد ساقه و تشکیل ساقه در *Eucalyptus* بکار گرفته شده اند. مجموعا ۸۶ و ۹۲ مارکر در میان ۱۱ گروه لینکاژی بطول 1295 cM و 1312 cM برای *E. urophylla* و*E. grandis* توزیع شدند. کاربرد این اطلاعات در گزینش زود هنگام درختان هیبرید بمنظور ازدیاد رویشی آنها برای تولید واریته های کلون شده مفید خواهد بود.

۴- گزینش به کمک مارکر (MAS)

گزینش به کمک مارکر مولکولی شامل امتیازدهی غیرمستقیم برای حضور یا فقدان یک فنوتیپ گیاهی مطلوب، براساس الگوی باندهی مارکرهای پیوسته بر یک ژل یا بر اتورادیوگرام (بسته به نوع سیستم مارکری مورد استفاده) است. استدلال این است که الگوی باندهی DNA بیانگر منشا والدی باندهای در حال تفرق در لوکوس مارکر مورد استفاده و نشاندهنده حضور یا فقدان یک قطعه کروموزومی خاص حامل آلل مطلوب است. این امر راندمان اسکرین در برنامه های اصلاحی را بوسیله روشهای زیر افزایش می دهد:

*می توان در همان مرحله گیاهچه، به افراد نسل های در حال تفرق برای صفاتی که بعدا در گیاه رشد یافته، بیان می شوند امتیاز داد. این امر شامل صفاتی مانند کیفیت دانه، نرعقیمی و حساسیت به طول روز است.

* اسکرین برای صفاتی که به سختی وبا صرف هزینه یا زمان زیاد امتیاز دهی و اندازه گیری می شوند، مانند تحمل به خشکی، شوری، مواد سمی، کمبود مواد معدنی، نوع مرفولوژی ریشه، مقاومت به نماتد و یا مقاومت به نژادها یا بیوتایپ های خاص بیماریها یا حشرات میسر است.

* گزینش می تواند بطور همزمان برای صفات مختلف، که گزینش آنها توسط روشهای متداول سخت و یا حتی غیر ممکن است، بکار گرفته شود.

*هموزیگوتها، براحتی و بدون نیاز به تست نتاج، ازهتروزیگوتها متمایز می شوند، این امر سبب صرفه جویی در زمان و انرژی می شود.

MAS انتخابی جذاب برای بهبود برخی صفات مورد علاقه که ارزیابی فنوتیپی آنها اغلب گران یا غیر قابل اعتماد است، می باشد. MAS امکان افزایش راندمان گزینش بوسیله تسهیل گزینش زود هنگام تر و

کاهش اندازه جمعیت گیاهی درطی گزینش را فراهم می کند. اصلاحگران نبات می توانند بسرعت الگوهای توارث پذیری در سطح ژنومی را بوسیله آزمون مستقیم ساختار ژنتیکی گیاهان آزمایشی، وقتی آنها هنوز گیاهچه هستند، را تعیین نمایند. این امر بخصوص برای صفاتی، مانند خصوصیات میوه، که تا هنگام بلوغ گیاه قابل شناسایی نیستند و همچنین صفاتی که آزمون آنها مشکل است، مفید است. گیاهان مقاوم برپایه مارکرهای DNA که با ژنهای کنترل گر صفت پیوسته هستند، بعنوان جایگزین ارزیابی عملی مقاومت به بیماری گیاه، گزینش می شوند. وارد ساختن ژنهای مقاومت طبیعی به واریته ها، موثرترین، اقتصادی ترین و ایمن ترین ابزارهای زیستی کنترل بیماری هستند. این امر پاسخی به تقاضا برای بصرفه ترین راه حلهای سبز است چرا که آن نیاز به موادشیمایی گرانقیمت برای کنترل بیماری را حذف می کند. آن یک روش متحدالشکل امتیازدهی است که درصد ژنوم حاصل از هر والد را بیان کرده و می گوید که کدامین بخشهای هر کروموزوم از هر والد بدست آمده اند. علاوه بر اینکه دقت گزینش افزایش یافته است، در نسلهای بعدی گیاهان، اثرات جانبی نامطلوب کمتری ظاهر می شود.MAS می تواند برای هرمی کردن دو یا چند ژن مطلوب در یک واریته جدید گیاهی بکار گرفته شود.

برخی امتیازات **MAS** در اصلاحگری بک کراس

مواردی وجود دارد که برنامه های بسیار متداول بک کراس شکست خورده اند. برای مثال، در برنامه های بک کراس، دیده شده که علیرغم انجام بک کراس دقیق والد تکرار شونده، نتاج حاصله به سبب شکست تلاقی، منحصرا از خودگشنی حاصل شده اند. بنابراین، در برنامه های اصلاحی متداول، اصلاحگران اغلب بر مواد ژنتیکی ای که می پندارند، کار نمی کنند، زیرا موارد شکست تلاقی بیش از انتظار رخ می دهند. یک دلیل شکست بک کراس، گروه بندی اشتباه یک گیاه از نظر حضور ژن انتقال یابنده (فرار از بیماری بجای مقاومت به بیماری) و استفاده از آن بعنوان والد در بک کراسهای بعدی است.

از همه این مشکلات و مشکلات دیگر مانند نیاز به صرف زمان و منابع برای شناسایی خصوصیت تکرار شونده تحت کنترل در نسلهای خودگشنی، در روش گزینش به کمک مارکر ممانعت می شود.

شرایط MAS در گیاهان مختلف

کار فراوانی در مورد گزینش به کمک مارکر(**جدول یک**) در کشورهای مختلف انجام شده است. پیشرفت های حاصل در برخی گیاهان اصلی در ادامه ارائه می شود.

برنج

تلاشهای مداوم قابل توجه برای اصلاح برپایه مارکر و هرمی کردن ژن در برنج شامل مقاومت به بلاست، بلایت، پشه ریزگالزا، پاکوتاهی و همچنین خشکی می باشد. بلایت باکتریایی(BB)، بوجود آمده بوسیله(Xoo) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*، یکی از مخرب ترین بیماریهای برنج در سراسر جهان و برخی مناطق آسیا است که عملکرد را تا ۵۰ درصد کاهش می دهد. موثرترین روش برای مبارزه با BB استفاده از ارقام مقاوم است. تاکنون، ۱۹ ژن مقاوم شناسایی شده اند و برخی از آنها در ارقام مدرن برنج وارد شده اند. اما، کاشت گسترده و طولانی مدت ارقام حامل تک ژن بسیار مهم مقاومت،*Xa-4*، سبب فراوانی Xoo شده است. در بسیاری از مناطق اندونزی، هند، چین و فیلیپین، ارقام برنج دارای تک ژن *Xa-4* برای مقاومت در برابر Xoo، حساس به پاتوژن شده اند. بنابراین، گزینش به کمک مارکر DNA برای هرمی کردن چهار ژن مقاومت به بیماری،*Xa-4*،*xa-5*،*xa-13* و-*Xa 21* انجام شده است. لاین های اصلاحی با دو، سه و چهار ژن مقاومت، توسعه یافته و از نظر مقاومت به پاتوژن بلایت باکتریایی تست شدند. لاینهای هرمی طیف وسیع و میزان بالاتری از مقاومت را نسبت به لاین های با تنها یک ژن نشان دادند. برای تسریع فرایندهای هرمی کردن ژن و تسهیل گزینش به کمک مارکر در آینده، مارکرهایPCR برای دو ژن مغلوب *xa-5*و*xa-13* ، گسترش داده شده و برای ارزیابی

طیفی از ژرم پلاسم برنج استفاده شدند. نتایج ارزیابی ژرم پلاسم، برای گزینش والدین مورد نظر در برنامه های اصلاحی انتقال ژنهای مقاومت به بلایت باکتریایی از یک بک گراند واریته ای به دیگری، مفید خواهد بود. در هند، سه ژن مقاومت به BB، *xa-5*، *xa-13* و*Xa-21* در بک گراند PR106 و Pusa 44 هرمی شدند. پس از آزمایشات تکرار دار و چند منطقه ای، دو لاین هرمی PR106 شناسایی شده و در آزمایشات هماهنگ هند در سال ۲۰۰۲ بکار گرفته شدند. این کار اولین تست محصول حاصل از MAS در سطح ملی، تاکنون بوده است. لاینهای هرمی Pusa 44 در طرحهای تکرار دار چند منطقه ای در طی سال ۲۰۰۲ مورد آزمون قرار گرفتند.

بلاست حاصل از قارچ*Magnaportha grisea*، دیگر بیماری مخرب برنج است. اقتصادی ترین و موثر ترین روش برای کاهش اتلاف محصول، اصلاح ارقام مقاوم به این بیماری است. اما، مقاومت اغلب در طی چند سال در رقم آزاد شده می شکند. بسیاری از ژنهای مقاومت کیفی به بلاست با استفاده از مارکرهای مولکولی(جدول۱) نقشه یابی شده اند و برخی از این مارکرها در MAS برای مقاومت به بلاست بکارگرفته شده اند. برای مثال،RG64، یک مارکر RFLP واقع بر روی کروموزوم ۶ بشدت به *Pi-2(t)*، یک ژن اصلی مقاومت به بلاست، پیوسته است(2.8 cM) . کلون RG64 ژنوم برنج توالی یابی شده و پرایمرهای مبتنی بر توالی های DNA، در تولید پلی مورفیسم میان واریته های حساس و مقاوم، پس از هضم محصولPCR مونومورف با آنزیمهای برشی، مفید ارزیابی شدند. سپس، مارکرCAPS برای شناسایی گیاهان برنج حامل *Pi-2(t)* که از یک جمعیت F2حاصل از تلاقی میان CO39 و CO10151 بدست آمده بودند، بکارگرفته شد. سپس، سودمندی گزینش گیاهان مقاوم بر پایه مارکرهای DNA پیوسته، با سودبخشی گزینش بر پایه فنوتایپینگ برای مقاومت به بلاست از طریق تست نتاج در خانواده های F3 بوسیله تلقیح بلاست، مقایسه شد. نتایج نشان داد که شناسایی گیاهان حامل *Pi-2(t)* در یک جمعیت در حال تفرق بزرگ با استفاده از یک مارکر پیوسته به همراه مارکرهای

پیرامونی میسر است. صحت شناسایی ژنوتیپ های مقاوم هموزیگوس، وقتی مارکر RG64 استفاده شد، ۹۶ درصد بود. صحت گزینش به میزان ۱۰۰ درصد افزایش یافت وقتی دو مارکر پیرامونی*Pi-2(t)* بطور همزمان امتیازدهی شدند. این نتایج نشان داد که شناسایی (به کمک مارکر) ژن هدف پیوسته در یک جمعیت در حال تفرق در شناسایی ژنوتیپ های مقاوم موثر است. این کار سپس برای هرمی کردن سه ژن اصلی مقاومت به بلاست گسترش یافت.

دیگر هدف اصلاح برپایه مارکر در برنج، انتقال مقاومت به پشه ریزه گالزا(*Orseolia oryzae*) ، یک حشره آفت عمده برنج، است. مقاومت به بیوتایپ های پشه ریزه گالزا بوسیله ژنهای غالب منفرد کنترل می شود. در سطح ملی، تلاش برای اسکرین ژرم پلاسم برنج برای منابع جدید ژنهای مقاومت موثر در برابر یک یا چند بیوتایپ آفت انجام شده است. مارکرهای مبتنی بر PCR طراحی شده و اخیرا در انستیتوهای مختلف تحقیقاتی بکار گرفته شده اند.

ژن نیمه پاکوتاهی (*sd-1*) در برنج یکی از مهمترین ژنهای منفرد در تاریخ اصلاح برنج است. این تک ژن مغلوب سبب کاهش ارتفاع ساقه شده و بطور گسترده ای برای حصول مقاومت به ورس، شاخص برداشت بالا، پاسخ به کود نیتروژن و تیپ مطلوب گیاهی در اصلاح واریته های با عملکرد بالا، مورد استفاده قرار گرفته است. در برنج، نقشه یابی مولکولی (*sd-1*) بدفعات گزارش شده است. در تحقیقی ۲۰کلون نقشه یابی شده را بعنوان پروب، براساس یک نقشه موجودRFLP، مورد استفاده قرار داده و آزمایشات تصدیق مکان ژن *sd-1* را انجام دادند. آنها راندمان گزینش به کمک مارکر در گیاهان F2 و F6حاصل از تلاقی Milyang 23/Gihobyeo را ارزیابی کردند. کاربرد MAS برای ژن*sd-1*،پتانسیل خوبی برای بهبود شدید راندمان برنامه های استرالیایی اصلاح برنج دارد. در برنامه اصلاحی آنها، خصوصیت نیمه پاکوتاهی وقتی حتی بعنوان یک هتروزیگوت در پیش از بلوغ شناسایی می شود، نیاز به آزمون نتاج در برنامه بک کراس را مرتفع می کند.

گندم

زنگ های ساقه و برگ گندم دو پاتوژن اصلی هستند که می توانند بطور بالقوه ای محصولات گندم را تخریب کنند. ارقام مقاوم عمدتا متکی به کنترل اپیدمی های بیماری می باشند. بیشتر ژنهای مقاومت با استفاده از مارکرهای مولکولی نقشه یابی شده و اخیرا بصورتMAS در مراکز ملی و بین المللی مختلف بکار گرفته شده اند. در هند، مارکرهای رپید پیوسته با ژن *Lr19* (زنگ برگ) به مارکرهایSCAR تبدیل شده اند. ژن *Lr 28*همچنین بوسیله دو مارکر پیرامونی رپید، S464700 وS326350، برچسب گذاری شده است. این مارکرهای مولکولی پیوسته در هرمی کردن ژنهای مقاومت به زنگ که انجامشان بوسیله پروسه های متداول اصلاحی زمان بر و سخت است، بکار گرفته شده اند. یک جمعیت متشکل از ۲۲۰گیاه BC1F2 در حال تفرق برای دو ژن *Cre1* و *Cre3* با سه مارکر مولکولی Xglk 605 ، Xcdo 588 و Cd 2.2 ارزیابی شده و معلوم شد که مارکرها ابزارهایی دقیق برای هرمی کردن ژن و گزینش گیاهان حامل ژنها در برنامه های اصلاحی گندم را ارائه کرده اند.

همراه با هدف جامع انتقال پیشرفت های جدید ژنومیکس به اصلاح و تولیدگندم، محققین حاضر در ۱۲ برنامه تحقیقی و اصلاحی عمومی گندم در سراسر آمریکا، یک کنسرسیوم ملی گزینش به کمک مارکر گندم را با هدف استفاده از مارکرهای مولکولی بعنوان شاخصه های کروموزوم در برنامه MAS جهت تسهیل اینتروگروسیون قطعات کوچک کروموزوم حامل ژنهای هدف، را تشکیل دادند. مارکرهای مولکولی موجود برای انتقال ژن های مقاومت به قارچ ها، ویروس ها و حشرات در کنار واریانت های ژن مرتبط به بهبود کیفیت نان، پاستا و رشته مورد استفاده قرار خواهند گرفت. این ژنها به حداقل ۲۴۰ رقم یا لاین اصلاحی سازگار متعلق به همه گروه های تجاری عمده گندم آمریکایی وارد خواهند شد و چون بوسیله تلاقی عادی منتقل شده اند، لاینهای حاصل بعنوان ترنس ژنیک گروه بندی نمی شوند. این ارقام بهبود یافته، نتیجه تحقیق ژنومی را به مزارع رشد گندم منتقل خواهند کرد.

دیگر محصولات

استفاده از مارکرهای مولکولی در گزینش به کمک مارکر برای بهبود گیاهان دیگر چون آفتابگردان، گوجه فرنگی، چغندرقند، جو، سویا، سیب و غیره در سراسر دنیا انجام می شود. در ادامه شرح مختصری در مورد آنها ارائه می شود:

آفتابگردان

MAS برای دو ژن مقاومت به زنگ آفتابگردان با استفاده از مارکرهای Ox20600 وOO04950 رپید که به ژن *RAdv* مسئول مقاومت به زنگ پیوسته هستند، در اینبرد لاین اختصاصیP2 ، گزارش شده است. این ژن سبب مقاومت به بیشتر پاتوتایپ های شناخته شده *Puccinia helianthi* در استرالیا می شود. این مارکرهای رپید به مارکرهایSCARتبدیل شده و قدرت این مارکرها از طریق تکثیر در طیف وسیعی از ژرم پلاسم آفتابگردان مشخص شد. این امر در تلاشهای بعدی برای اصلاحگری مولکولی برای ایجاد مقاومت پایدار به *P. helianthi* در آفتابگردان مفید خواهد بود.

گوجه فرنگی

MAS برای صفات مختلف شامل خصوصیات میوه گوجه فرنگی بکار گرفته شده است. اخیرا، MAS برای انتقال توانایی تجمع acylsugar ها به گوجه فرنگی استفاده شده است.RFLP و مارکرهای مبتنی بر PCR در سه نسل بک کراس برای گزینش گیاهان حاوی پنج ناحیه هدف مرتبط با تجمع acylsugar بکارگرفته شدند. در مثالی دیگر، اثرMAS برای QTL موثر بر مقاومت به کپک سیاه نشان داده شد. کپک سیاه حاصل از قارچ*Alternaria alternate* ، یک بیماری عمده گوجه های رسیده در حال فرآوری است. پنجQTL، با استفاده از گزینش به کمک مارکر، برای اینتروگروسیون از*Alternaria alternata* بدرون گوجه فرنگی زراعی انتخاب شده اند. RFLP و مارکرهای مبتنی

برPCR پیرامون و درون نواحی کروموزومی حاوی QTL ها، برای MAS در طی نسل های بک کراس و خودگشنی استفاده شدند.

جو

سودمندی گزینش به کمک مارکر مولکولی برای صفت کیفیت مالت در جو گزارش شده است. در این گزارش مارکرهای پیرامونی Brz و Amy2، و WG622 و BCD402B، برای دو QTL اصلی حاضر بر روی کروموزومهای ۱و ۴ برای MAS استفاده شدند.MAS برایQTL1 نسبت به گزینش فنوتیپی موثرتر بود. آن می تواند بطور پایدار ژنوتیپ های نامطلوب را بوسیله ژنوتایپینگ زود هنگام حذف کرده و تنها ژنوتیپهای مطلوب را برای گزینش فنوتیپی دیرهنگام نگهدارد. MAS همچنین برای تایید QTL عملکرد در یک تلاقی جو بکارگرفته شد. اهداف این مطالعه تایید ارزش چهارQTL برای گزینش و مقایسه راندمان استراتژیهای جانشین مبتنی بر MAS با استفاده از اینQTL ها در برابر گزینش متعارف فنوتیپی برای عملکرد دانه بود. این امر نشان داد که MAS بخوبی گزینش فنوتیپی بود.

سویا

MAS پتانسیل کاهش linkage drag و پتانسیل هرمی کردن ژنهای با اثرات فنوتیپی ساده در ژنوتیپ های الیت را اعطا می کند. چنین مثالی در برنامه اصلاح سویا وقتی یک QTLمقاومت به کرم سنبله ذرت در مجموعه PI229358 و یک ترنس ژن مصنوعی*Bacillus thuringiensis cry1Ac* حاصل از والد تکرار شونده 'Jack-Bt' ، بواسطه گزینش به کمک مارکر در درون گیاهانBC2F3، هرمی شدند، مشاهده شد. افراد در حال تفرق در مارکرهای SSR پیوسته با یک QTL آنتی بیوز/آنتی زنوز بر گروه لینکاژی M، ژنوتایپینگ شده و برای حضور *cryAc1* تست شدند. MAS در حین و پس از دو بک کراس برای توسعه یک مجموعه از گیاهان BC2F3 با یا بدون ترنس ژن *cryAc1* وQTL مسئول

مقاومت در گیاهان BC2F3 که برای آللهای والدی در مارکرها هموزیگوس بودند، بکار گرفته شد. این کار مفید بودن SSR برای MAS در سویا را نشان داد و نشان داد که ترکیب ترنس ژن و QTL مقاومت به حشرات لپیدوپترا ممکن است یک استراتژی پایدار برای کنترل حشره باشد.

سیب

همچنین MAS یک روش امید بخش برای گزینش افراد مقاوم در محصولات باغی چون سیب است. ابزارهای مولکولی پتانسیل کسب اطلاعات بسیار زودهنگام در مورد ژنتیک نهالهای سیب را دارند. اهداف اصلاحی سیب مانند کیفیت بالای میوه، عملکرد بالای منظم و مقاومت پایدار به بیماری و آفت می تواند با راندمان بیشتری بدست آیند. پیشرفت در MASبرای اصلاح سیب عمدتا در حوزه مقاومت به بیماری بخصوص در ترکیب مقاومت به اسکب و کپک حاصل شده است. آنالیز مولکولی AL07-SCAR و M18-CAPS در نتاج، که هر دو والد از نظر ژن مقاومت هتروزیگوس هستند، شناسایی گیاهان هموزیگوس برای ژن *Vf* (مقاومت به اسکب سیب)را بروشنی میسر ساخته و این گیاهان میزان بالاتری از مقاومت را نسبت به گیاهان هتروزیگوس نشان می دهند. نتاج از طریق تلاقی با والدین حامل QTL ها و ژنهای مقاومت مختلف مانند *Vf*، *Vm*، *Vb* و *Pl1*، بصورت ترکیبات مختلف، بهبود پیدا کردند.

بلوگراس کنتاکی

MASکاربرد گسترده ای در اصلاح این گونه های علفی دارد. گزارش شده که MASامکان اجتناب از آزمونهای پرخرج و زمانبر فنوتیپی نتاج در*Poa pratensis* برای مطالعه شرایط تکثیر را فراهم می کند. آپومیکسی ژنوتیپی در بلوگراس شامل توسعه پاتنوژنتیکی تخمهای کاهش نیافته حاصل از کیسه های جنین آپوسپوری می باشد. دو جفت پرایمر SCAR تست شده و ژنوتیپهای جنسی و آپومیکتیت را در میان

نتاج تلاقی های جنسی × آپومیکسی، تنها با اندکی تردید، شناسایی کردند. علاوه بر این، وقتی پرایمرها بر گستره وسیعی از ژرم پلاسم ایتالیایی و خارجی *P. pratensis* تست شدند، آنها قادر به شناسایی ژنوتیپ های جنسی از اپومیکسی بودند. این سیستم، بنابراین، باید امکان بکارگیری مدلهای جدید گزینش در این گونه ها را فراهم کند.

۵- چشم انداز آینده MAS

مروری بر منابع موجود نشان می دهد که در طی سالیان پس از انتشار نخستین مقاله در مورد کاربرد مارکرهای RFLP برای تهیه نقشه های لینکاژ در گوجه فرنگی و سیب زمینی در ۱۹۸٦، مارکرهای مولکولی بطور گسترده ای برای نقشه یابی و برچسب زنی هزاران ژن/ QTL مهم زراعی در گونه های زراعی مختلف بکارگرفته شده اند. با دسترسی به مارکرهای پیوسته، نخستین نیاز انجام MAS بطور موفقیت آمیزی برطرف شده است. در کنار این، قابلیت انجام MAS برپایه این مارکرهای پیوسته در گیاهان مختلف برای صفات کیفی و کمی بعنوان دلیلی بر توضیح گفته شده، نشان داده شده است. اما، هنوز MAS بطور متداول در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار نمی گیرد.

کاربرد MAS در گیاهان زراعی، اخیرا بوسیله فاکتورهایی چون نوترکیبی میان مارکر و ژن هدف، میزان پایین پلی مرفیسم میان والدین با صفات متضاد و وضوح کمتر QTL ها به سبب برهمکنش با محیط، محدود شده است. با پیشرفتهای اخیر در ژنومیکس ساختاری و عملکردی، یافتن راه حل این مشکلات سخت نخواهد بود. دسترسی به نقشه های فیزیکی و ژنتیکی با تراکم بالا، یافتن مارکرهای از نظر فیزیکی نزدیک تر به ژن هدف که مانع از شکست MAS به سبب نوترکیبی ژنتیکی می شود، را میسر می سازد. علاوه بر این، کلونینگ و شناسایی ژنهای هدف، برپایه موقعیت شان در نقشه لینکاژی، توسعه مارکرهای اختصاصی آلل را میسر می سازد. استفاده از چنین مارکرهایی امکان شکستن پیوستگی صفت – مارکر

را کاملا برطرف می کند. در کنار این، مارکرهای مبتنی بر توالیهای ژنها، بحداکثر رساندن آلل در منابع ژرم پلاسم را میسر ساخته و بنابراین منجر به شناسایی و کاربرد آللهای جدید تر در اصلاح گیاه می شوند. آللهای مختلف یک ژن از لحاظ تعداد نوکلئوتیدها در مکانهای مختلف توالیهای آنها متفاوت هستند که این امر پایه توسعه بسیار پلی مورف مارکرهای پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی(SNP) خواهد بود. مشکل میزان اندک پلی مرفیسم در تلاقیهای باریک می تواند بنابراین ممانعت شود. استفاده از MASبرایQTL، بخصوص آنهایی که اثر اندکی بر بیان ژن داشته و با محیط برهمکنش زیادی دارند تحقیق بیشتر و استراتژیهای آزمایشی جدیدتر را ضروری می سازد.

ادغام کامل MAS با برنامه های اصلاحی کلاسیک و سنتی، نیازمند ملاحظه دو فاکتور مهم است: ۱- اندازه جمعیت ۲- هزینه. اصلاح گیاه نیازمند اسکرین مرتب جمعیت های بزرگ در حال افتراق در طی نسلهاست. ژنوتایپینگ تعداد زیادی نمونه ها بطور دستی کاری بسیار دشوار است. قابلیت انجام MAS باید بطور اتوماتیک میسر باشد تا امکان مدیریت تعداد زیادی نمونه فراهم شود. توسعه و استفاده از مارکرهای مبتنی بر PCR مانندSTS و SCAR کلید موفقیت MAS در اصلاح گیاه است. همچنانکه تکنولوژی برای آنالیز تعداد زیادی نمونه توسعه و تغییر می یابد، هزینه MAS کاهش خواهد یافت. سرمایه گذاری در برچسب زنی ژن، و گزینش برپایه مارکرهای مولکولی باید در برابر مجموع هزینه و زمان مورد نیاز روشهای اصلاح سنتی، بهره بیشتری داشته باشد. اگرچه در حال حاضر، هزینه MAS بیش از هزینه روشهای اصلاح سنتی تخمین زده می شود، ادغام آن با اصلاح سنتی به سبب امکانات بسیاری که عرضه می کند، مطلوب است.