DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jsb.2014.5048

تأیید نشانگرهای مولکولی ناجفت پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا (*Rz1*) و بررسی اثر دز ژن در ژنوتیپ‌های چغندرقند

Confirmation of repulsion molecular markers linked to rhizomania resistance gene (*Rz1*) and evaluation of gene dose effect in sugar beet genotypes

پیمان نوروزی[1]*، دنا رحمانی[2]، سمانه اروجعلیان[3]، سید باقر محمودی[1]، محسن آقائی‌زاده[4]، مژده کاکوئی‌نژاد[4]، محمدرضا اوراضی‌زاده[4]، سعید واحدی[4]، و محمدرضا فتحی[5]

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش:۹۲/۵/۲۷

پ. نوروزی، د. رحمانی، س. اروجعلیان، س. ب. محمودی، م. آقائی‌زاده، م. کاکوئی‌نژاد، م.ر. اوراضی‌زاده، س. واحدی، م.ر. فتحی. ۱۳۹۲. تأیید نشانگرهای مولکولی ناجفت پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا (*Rz1*) و بررسی اثر دز ژن در ژنوتیپ‌های چغندرقند. **مجله چغندرقند ۲۹(۲): ۱۴۵- ۱۳۳**

چکیده

ریزومانیا مهم‌ترین بیماری چغندرقند در ایران و برخی از مناطق جهان است که می‌تواند نقش مهمی در کاهش عملکرد محصول داشته باشد. مناسب‌ترین راه‌کار مقابله با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. ردیابی ژن‌های مقاومت با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی ضروری است. در این تحقیق برای تایید و تکرارپذیری شش نشانگر مولکولی ناجفت، از چندین توده اصلاحی و رقم تجارتی چغندرقند که حامل ژن مقاومت *Rz1* بودند استفاده شد. برای این منظور از داده‌های موجود الایزا مربوط به ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت به ریزومانیا در چندین توده اصلاحی استفاده شد. برای آزمون مولکولی، نمونه‌های برگی از گیاهان مورد نظر جداسازی و پس از استخراج DNA، آزمون RAPD-PCR با کمک آغازگرهای مرتبط با نشانگرهای مورد نظر انجام گرفت. سپس محصولات RAPD بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی، نتایج مربوط به نشانگرها مشاهده و به حضور و عدم حضور نشانگر امتیازدهی شد. سپس درصد توافق نتایج نشانگرها با داده‌های الایزای مربوط به تک بوته‌ها در توده‌های اصلاحی و نیز درصد حضور نشانگرها در ارقام تجارتی محاسبه گردید. مقایسه بین نتایج الایزا و آزمون مولکولی نشان داد که نشانگرهای ناجفت (نشانگر پیوسته با آلل حساسیت) PN3 و PN7-2 به ترتیب با نسبت توافق ۹۲ و ۹۸ درصد با نتایج الایزا و به ترتیب با نسبت حضور ۸۷ و ۹۰ درصد در ارقام تجارتی حساس و نسبت حضور ۷۵ و ۹۷ درصد در ارقام تجارتی مقاوم از نشانگرهای مناسب برای شناسایی آلل حساسیت *rz1* می‌باشند. هم‌چنین نتایج اثر دز ژن نشان داد که میانگین OD الایزا گیاهانی با ژنوتیپ هموزیگوت غالب (*Rz1Rz1*) به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهانی با ژنوتیپ هتروزیگوت (*Rz1rz1*) در نشانگرهای ناجفت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، مقاومت، ریزومانیا، نشانگر مولکولی، RAPD-PCR

۱- دانشیار مؤسسه تحقیقات چغندرقند- کرج * - نویسنده مسئول norouzi@sbsi.ir

۲ - دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران- تهران

۳ - دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج- کرج

۴ - مربی مؤسسه تحقیقات چغندرقند- کرج

۵ - کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات چغندرقند- کرج

مقدمه

اهمیت چغندرقند

چغندرقند یکی از دو محصول مهم تأمین کنندهٔ قند در جهان می‌باشد. سطح کشت جهانی آن بالغ بر نه میلیون هکتار است. در حال حاضر بیش از ۳۴ میلیون تن از تولید شکر جهانی (۲۹ درصد) را به خود اختصاص داده است که تقریباً ۲۷ میلیون تن آن در اروپا، ۴/۵ میلیون تن در آمریکای مرکزی و شمالی، ۲/۵ میلیون تن در آسیا، ۸۴۰ هزار تن در آفریقا و ۴۵۰ هزار تن در آمریکای جنوبی تولید می‌شود (Draycott 2006). میزان تولید ریشه چغندرقند در داخل کشور حدود چهار میلیون و ششصد هزار تن در سال قبل بوده است (Ananymus 1390).

بیماری ریزومانیا

مهم‌ترین بیماری که گیاه چغندرقند را تهدید می‌کند ریزومانیا می‌باشد که زراعت این گیاه را مختل نموده است. این بیماری که از مخرب‌ترین بیماری‌های چغندرقند است، می‌تواند حتی تا صددرصد محصول این گیاه را از بین ببرد. این بیماری اولین بار در ایران توسط ایزدپناه و همکاران از فارس گزارش شد (Izadpanah et al. 1375). متعاقب آن بیماری از اکثر مناطق چغندرکاری کشور گزارش گردید (Toodehfallah et al. 1379). ویروس عامل بیماری ریزومانیا یا BNYVV(Beet Necrotic Yellow Vein Virus) (Tamada 1975) توسط قارچی بنام پلی‌میکسا بتا(*Polymyxa beta* keskin) منتقل می‌شود (Keskin 1964). تنها راه حفاظت محصول چغندرقند در مزرعهٔ آلوده به BNYVV، کشت ارقام مقاوم است. عمدتاً دو ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند شناسایی شده‌اند که از منابع مختلف منشأ گرفته‌اند و به صورت Rz_1 و Rz_2 نام‌گذاری شده‌اند (Scholten and Lange 2000).

اهمیت نشانگرهای DNA در بررسی منابع مقاومت به بیماری

با توجه به آن که روش‌های ارزیابی کلاسیک گزینش مقاومت به بیماری از نوع فنوتیپی بوده و وابسته به شرایط محیطی و یکنواختی عامل آلوده‌کننده هستند و در فصل خاصی از سال انجام می‌گیرند و نیز بعضی گیاهان از عامل آلوده‌کننده به نحوی می‌گریزند و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی، به‌عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می‌توان گیاهان دربردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. بنابراین نشانگرهای مولکولی DNA می‌توانند ابزاری مفید برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم باشند و باعث صرفه‌جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب گردند (Norouzi 1387).

نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت به ریزومانیا

پلسی و مردینوگلو (Pelsy and Merdinoglu 1996) از روش BSA برای شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در منبع Holly استفاده نمودند. از ۱۶۰ آغازگر استفاده شد که ۱۹ آغازگر ۴۴ نشانگر چندشکل تولید نمودند که در ۹ گروه پیوستگی طبقه‌بندی شدند. شولتن و همکاران (Scholten et al. 1997 and 1999)، نام Rz_1 را برای ژن Holly و نام Rz_2 را برای ژن (های) WB42 پیشنهاد نمودند. امیری (Amiri 2003) گزارش نمود که مقاومت در منبع WB42 با یک ژن غالب(*Rz2*) کنترل می‌شود و فاصله آن از ژن *Rz1* در منبع Holly حدود ۳۵ سانتی مورگان می‌باشد. امیری و همکاران (Amiri et al. 2003) با بررسی وراثت مقاومت به بیماری ریزومانیای چغندرقند دریافتند که ژن‌های مقاومت در منابع Holly و WB42 غیرآللی و به صورت پیوسته می‌باشند. امیری (2003)

با استفاده از تکنیک RAPD در جمعیت F2 حاصل از تلاقی رگه‌های نرعقیم ۲۶۱ و چغندر یک ساله با منابع مقاومت Holly و WB42 موفق گردید یک نشانگر ناجفت (Repulsion) با پیوستگی شدید (با فاصله ۳/۶ سانتی مورگان) برای مکان ژنی *Rz2* حاصل از منبع WB42 و یک نشانگر جفت با پیوستگی کم برای مکان ژنی *Rz1* حاصل از منبع Holly به دست آورد. لین و همکاران (Lein et al. 2007) با استفاده از چهار آنالوگ ژن مقاومت از چغندرقند به نام‌های (cZR-1 ، cZR-9 ، cZR-7 و cZR-3) دریافتند که این آنالوگ‌ها بر روی کروموزوم شماره ۳ قرار داشته و همراه با جایگاه ژن کمی بزرگ اثر مقاومت به ریزومانیا تفکیک می‌شوند. نوحی و همکاران (Nouhi et al. 2008) نیز با استفاده از روشی مشابه و با استفاده از نشانگر RAPD، موفق به شناسایی دو نشانگر بنام‌های OF-09 با اندازه ۱۱۵۰ جفت باز در وضعیت جفت و فاصله ۲۷ سانتی مورگان از ژن *Rz1* و دیگری OP-AN9 با اندازه ۶۰۰ جفت باز در وضعیت ناجفت و با فاصله ۱۳/۷ سانتی مورگان از ژن *Rz1* شدند. این نتایج عیناً توسط مصباح (Mesbah 2007) نیز گزارش شده است. نوروزی (Norouzi 2008) و نوروزی و فقهی (Norouzi and Feghhi 2009) با استفاده از تکنیک RAPD موفق به شناسائی نشانگرهای R1 و R2 به ترتیب در فواصل ۲/۳۲ و۸/۳ سانتی مورگان از ژن *Rz1* در فاز ناجفت و نشانگرهای C4 وC1 به ترتیب در فواصل ۲۱/۴ و ۲۷/۵ سانتی مورگان از ژن *Rz1* در فاز جفت شدند.

هدف از این تحقیق بررسی تکرارپذیری و تأیید نشانگرهای ناجفت پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیای چغندرقند از منبع زراعی Holly و بررسی اثر دز ژن مقاومت از طریق مقایسه نتایج نشانگرها با نتایج آزمون الایزا و تعیین درصد حضور نشانگرها در ارقام تجاری مقاوم و حساس چغندرقند برای ارزیابی سریع ژرم‌پلاسم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ژنوتیپ‌های گوناگون چغندرقند شامل توده‌های اصلاحی S_1-A (گرده‌افشان‌های مقاوم به ریزومانیا حاصل از بالک شیراز)، S_2-A (گرده‌افشان‌های توده FC-709-2 همدان) و S_1-B (اوتایپ‌های مقاوم به ریزومانیا)، FC (توده‌های اصلاحی منوژرم و مولتی‌ژرم مقاوم به ریزومانیا)، والد گرده‌افشان ۲۰۳۲۲ (رقم HM1990)، ارقام تجارتی حساس رجینا، شیرین و رسول و ارقام مقاوم فلورس، دوروتی، بیریجیتا و لاتیتیا و ارقام متحمل زرقان و جام جهت تأیید شش نشانگر ناجفت پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا به کار رفتند. در اغلب ژنوتیپ‌ها بین ۱۵۰–۲۰ بوته بررسی شد.

نشانگرهای مورد آزمون

نشانگرهای مولکولی RAPD ناجفت پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا (Rz_1) شامل PN3, PN7-1, PN7-2, PN10, PN11-2, PN13-3 که بر اساس منابع داخلی و خارجی جهت تأیید و تکرارپذیری آن‌ها در توده‌های اصلاحی داخلی و ارقام تجارتی مقاوم و حساس به ریزومانیا انتخاب شدند. تکثیر این نشانگرها با آغازگرهای تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی به صورت تک و یا جفت آغازگر انجام گرفت. توالی این آغازگرها پس از ثبت در بانک ژن قابل استفاده سایر محققان خواهد بود.

آزمون الایزا (ELISA) برای اندازه‌گیری غلظت ویروس BNYVV

اندازه‌گیری غلظت ویروس در ریشه‌چه گیاهان با استفاده از آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) مطابق روش معمول کلارک و آدامز (Clark and Adams 1977)، که در آزمایشگاه گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات چغندرقند واقع در کرج بهینه‌سازی شده بود انجام شد (Amiri et al. 2003).

استخراج DNA

استخراج DNA با روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al. 1983) انجام شد.

آزمون مولکولی APD - PCR

واکنش زنجیره پلی‌مراز برای انجام RAPD در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش انجام گرفت. حجم مورد نیاز DNA در یک واکنش، ۱/۵ میکرولیتر با غلظت ۲۵ng/µl، ۲/۵ میکرولیتر buffer 10x، ۲ میکرولیتر dNTP ۲/۵ میلی‌مولار، ۱/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، یک میکرولیتر آغازگر با غلظت ۳۰ ng/µl، ۰/۲ میکرولیتر(یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی‌مراز بود. واکنش زنجیره پلی‌مراز برای آزمون RAPD در دستگاه ترموسایکلر با مراحل زیر شامل: ۵ دقیقه واسرشت سازی اولیه در °C ۹۴، ۴۰ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، اتصال آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۳۴°C، توسعه آغازگر به مدت ۸۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای ۷۲°C برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش صورت گرفت. سپس الکتروفورز محصولات واکنش RAPD یا PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰، رنگ‌آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و عکس برداری در دستگاه مستندساز ژل انجام گرفت. در نهایت الگوی نواربندی ژنوتیپ‌ها روی ژل مشخص شد.

محاسبات آماری

برای محاسبه فواصل نشانگرها با مکان ژنی Rz_1 در حالت ناجفت از روش بارزن و همکاران (Barzen et al. 1997) به صورت زیر استفاده شد:

$$\text{فاصله نشانگر در حالت ناجفت} = \frac{\text{تعداد برنه های حساس غالب یا نالب}}{\text{تعداد کل برنه های مورد آزمون}}$$

برای تعیین درصد توافق نتایج الایزا با داده‌های مولکولی از رابطه زیر استفاده گردید:

$$\text{درصد توافق نتایج الایزا با داده های مولکولی} = \frac{\text{تعداد نمونه هایی که نتایج مولکولی آن‌ها با آزمون الایزا توافق داشته}}{\text{تعداد کل نمونه‌های مورد آزمون}} \times 100$$

برای تعیین اثر دز ژن *RZ1* در ژنوتیپ‌های مقاوم از طرح کاملاً تصادفی نامتعادل بر اساس مقایسه داده‌های الایزا و نتایج مولکولی استفاده گردید. با توجه به نرمال نبودن داده‌های مقادیر الایزا، قبل از تجزیه آماری از تبدیل لگاریتمی (در پایه ۱۰) استفاده شد. داده‌های تبدیل شده با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., cary, NC) تجزیه واریانس و مقایسه میانگین شدند. پس از تجزیه واریانس و مقایسه تیمارها بر روی داده‌های تبدیل شده، میانگین تیمارها به مقیاس اصلی خود برگردانده شد.

نتایج و بحث

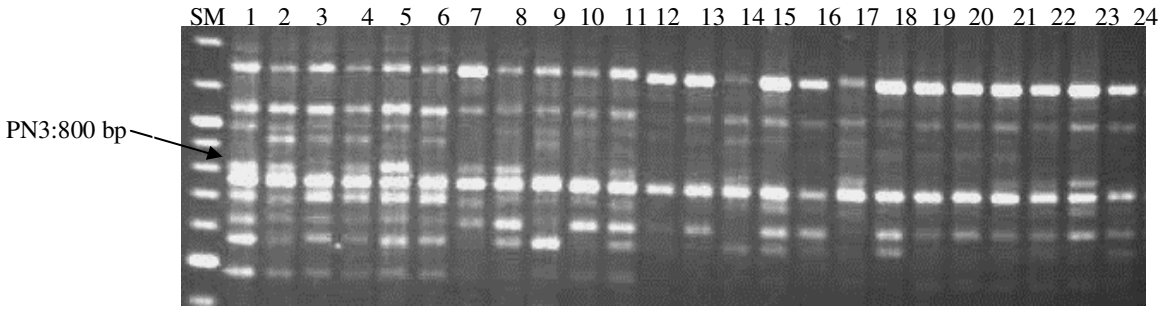
بررسی نتایج آزمون الایزا

پس از انجام آزمون الایزا نمونه‌ای که دارای غلظت بیشتر ویروس در ریشه‌های خود است (فرد حساس‌تر) رنگ زرد پررنگ‌تری در چاهک‌های پلیت الایزا نشـان می‌دهـد و عـددی که دستـگاه الایزا خوان آشکار می‌سازد بالاتر است. با اندازه‌گیری $2\overline{X}$ و $\overline{X}$+3Sd به ترتیب خط‌کش بالا و پایین برای ارزیابی مقاومت نمونه‌ها به‌دست می‌آید. بر اساس روش امیری و همکاران (2003) نمونه‌های با OD بالای $2\overline{X}$ حساس (S)، با OD پایین‌تر از $\overline{X}$+3Sd مقاوم و غیرآلوده (R) در نظر گرفته شدند.

در توده‌هایی که الایزای آن‌ها مشخص شده بود، درصد توافق بین نتایج به دست آمده از آزمون الایزا و RAPD، محاسبه شد و در سایر توده‌ها تنها درصد حضور ژن تعیین گردید. لازم به ذکر است که برای تأیید نشانگرهای منتخب در توده‌های اصلاحی، درصد توافق نشانگر با الایزا و در ارقام تجارتی درصد حضور یا عدم حضور نشانگر از اهمیت خاصی برخوردار است که این مسئله در کلیه نتایج مندرج در جداول مربوط به نشانگرها دیده می‌شود. نتایج مربوط به هر یک از نشانگرهای بررسی شده در این تحقیق به شرح زیر می باشند:

نشانگر PN_3

باند مشاهده شده در ژنوتیپ‌های به کار رفته برای این نشانگر در حدود ۸۰۰bp به حالت ناجفت بود (شکل ۱). این نشانگر روی هریک از توده‌های اصلاحی S_1 ، S_2 ، توده‌هایFC، والد گرده‌افشان HM1990، ارقام تجارتی حساس و مقاوم آزمون گردید (جدول ۱). درصد توافق نتایج نشانگر مذکور با نتایج الایزای تک‌بوته‌ها در سه توده اصلاحی S1و S2 بین ۸۶ تا ۱۰۰ درصد بود. در رقم تجارتی مقاوم فلورس نشانگر ناجفت دیده نشد (یک دلیل احتمالی، هموزیگوت بودن ژن غالب *Rz1* در این رقم می‌باشد).



شکل ۱ الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر ناجفت PN3 در توده‌های اصلاحی S1-A (ستون‌های ۱۱-۱) و S1-B (ستون‌های ۲۴-۱۲). ستون‌های ۱، ۲، ۵، ۸، ۱۷ و ۲۳ مربوط به بوته‌های حساس، ستون‌های ۳،۴، ۷، ۱۱، ۱۴، ۲۱ و ۲۲ مربوط به بوته‌های مقاوم هتروزیگوت و ستون‌های ۶، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۴ مربوط به بوته‌های مقاوم هموزیگوت می‌باشند). باند ۸۰۰ جفت باز نشانگر مربوط به آلل حساسیت در تک بوته‌های حساس یا هتروزیگوت دیده می‌شود. SM: نشانگر تعیین اندازهDNA (Lambda DNA /*Eco*RI+*Hin*dIII Marker)

جدول ۱ نتایج تکرارپذیری نشانگر ناجفت PN3 در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند

ردیف	نوع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های مورد آزمون	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده‌های اصلاحی S_1-A	۱۲۰	۹۲	...
۲	توده‌های اصلاحی S_2-A	۷۳	۱۰۰	...
۳	توده‌های اصلاحی S_1-B	۱۱۶	۸۶	...
۴	توده های اصلاحی FC	۶۹۱	...	۷۸
۵	گرده افشانHM1990	۱۶۷	...	۷۹
۶	رقم فلورس	۱۵	...	۰
۷	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۱۰۱	...	۷۵
۸	ارقام تجارتی زرقان و جام	۲۲	...	۹۱
۹	ارقام تجارتی حساس**	۷۵	...	۸۷

* ارقام تجارتی مقاوم: فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیتیا ** ارقام تجارتی حساس: رسول، شیرین و رجینا

نشانگر PN7

باندهای مشاهده شده در ژنوتیپ‌های به کار رفته برای این نشانگر به ترتیب در اندازه‌های حدود ۱۲۸۰ ناجفت (با نام نشانگر PN7-1) و ۱۳۵۰ ناجفت (با نام نشانگر PN7-2) به دست آمده است که نتایج این دو نشانگر در جداول ۲ و ۳ و الگوی باندی آن‌ها در شکل‌های ۲ و ۳ آمده است.

جدول ۲ نتایج تکرارپذیری نشانگر ناجفت PN7-1 در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند

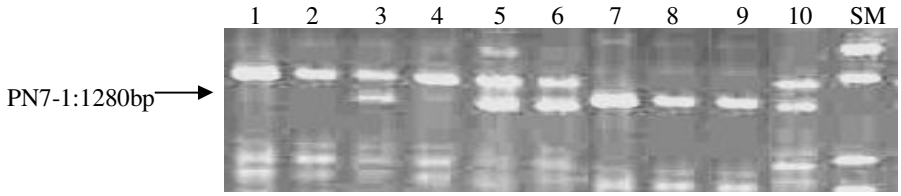
ردیف	نوع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های مورد آزمون	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده‌های اصلاحی S_1-A	۶۰	۹۵	...
۲	توده‌های اصلاحی S_2-A	۴۱	۸۳	...
۳	توده‌های اصلاحی S_1-B	۸۱	۹۹	...
۴	توده های اصلاحیFC	۱۶	...	۶۹
۵	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۳۸	...	۴۰
۶	ارقام تجارتی زرقان و جام	۱۳	...	۴۶
۷	ارقام تجارتی حساس**	۳۸	...	۷۶

* ارقام تجارتی مقاوم: فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیتیا ** ارقام تجارتی حساس: رسول، شیرین و رجینا

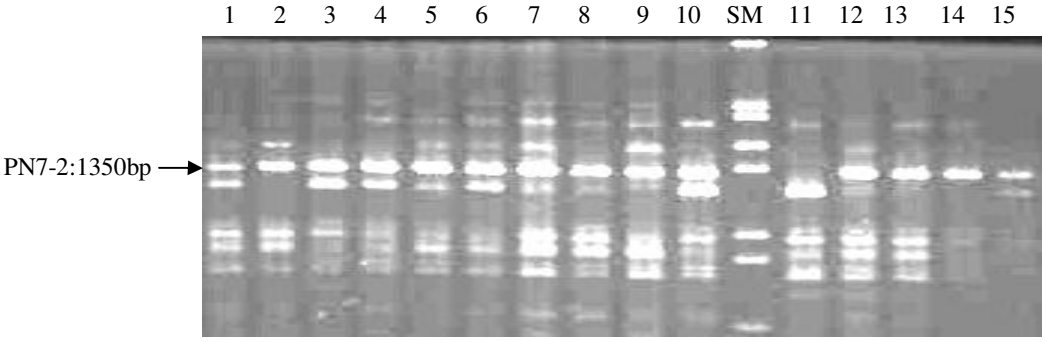
جدول ۳ نتایج تکرارپذیری نشانگر ناجفت PN7-2 در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند

ردیف	نوع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های مورد آزمون	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده‌های اصلاحی S_1-A	۹۰	۹۸	...
۲	توده‌های اصلاحی S_2-A	۴۱	۱۰۰	...
۳	توده‌های اصلاحی S_1-B	۹۸	۹۷	...
۴	توده های اصلاحیFC	۱۶	...	۱۰۰
۵	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۶۵	...	۹۷
۶	ارقام تجارتی زرقان و جام	۱۳	...	۸۵
۷	ارقام تجارتی حساس**	۴۸	...	۹۰

* ارقام تجارتی مقاوم: فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیتیا ** ارقام تجارتی حساس: رسول، شیرین و رجینا



شکل ۲ الگوی الکتروفورزی نشانگر ناجفت PN7-1 در ۱۰ نمونه از توده S1-A، SM: نشانگر تعیین اندازهDNA (Lambda DNA) /*Eco*RI+*Hin*dIII Marker



شکل ۳ الگوی الکتروفورزی نشانگر ناجفت PN7-2 در ۱۵ نمونه از توده S1-A،SM: نشانگر تعیین اندازهDNA(Lambda DNA) /*Eco*RI+*Hin*dIII Marker

نشانگر PN10

باند مشاهده شده برای این نشانگر در اندازهٔ حدود bp ۹۰۰ به صورت ناجفت بود. این نشانگر روی هر یک از توده‌های اصلاحی S_1 ، S_2، رقم تجارتی حساس رسول و مقاوم بریجیتا آزمون گردید و نتایج آن به صورت جدول ۴ به‌دست آمد.

جدول ٤ نتایج تکرارپذیری نشانگر ناجفت PN10 در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند

ردیف	نوع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های مورد آزمون	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده‌های اصلاحی S_1-A	۳۰	۹۰	...
۲	توده‌های اصلاحی S_2-A	۱۰	۹۰	...
۳	رقم مقاوم بریجیتا	۶	...	۸۳
۴	رقم حساس رسول	۵	...	۶۰

نشانگر PN11-2

باند مشاهده شده برای این نشانگر حدود bp ۵۰۰ ناجفت بود که روی هر یک از توده های اصلاحی S_1 ، S_2، رقم تجارتی حساس رسول و مقاوم بریجیتا آزمون گردید و نتایج آن به صورت جدول ۵ به دست آمد.

جدول ۵ نتایج تکرارپذیری نشانگر ناجفت PN11-2 در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند

ردیف	نوع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های مورد آزمون	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده‌های اصلاحی S1-A	۱۷	۷۶	...
۲	توده‌های اصلاحی S2-A	۱۰	۸۰	...
۳	رقم مقاوم بریجیتا	۱۳		۱۰۰
۴	رقم حساس رسول	۸	...	۱۰۰

نشانگر PN_{13-3}

باند مشاهده شده برای این نشانگر شامل bp ۸۳۰ ناجفت (به نام PN13-3) بود. نشانگر مذکور روی هریک از توده‌های اصلاحی S_1، S_2، توده‌هایFC، ارقام تجارتی حساس و مقاوم آزمون گردید. درصد حضور و درصد توافق برای آن در جدول ۶ به دست آمد.

جدول ٦ نتایج تکرارپذیری نشانگر ناجفت PN13-3 در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند

ردیف	نوع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های مورد آزمون	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده‌های اصلاحی S_1-A	۱۶	۸۸	...
۲	توده‌های اصلاحی S_2-A	۳۳	۹۷	...
۳	توده‌های اصلاحی S_1-B	۴	۱۰۰	...
۴	های اصلاحیتودهFC	۱۵	...	۷۳
۵	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۴۷	...	۸۵
۶	ارقام تجارتی حساس**	۴۴	...	۵۹

* ارقام تجارتی مقاوم: فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیتیا

** ارقام تجارتی حساس: رسول، شیرین و رجینا

جمع‌بندی نشانگرهای ناجفت مورد آزمون

نتیجهٔ کلی نشانگرهای مورد آزمون درجدول ۷ خلاصه شده است. در هر یک از نشانگرها درصد توافق کلی نشانگر با نتایج الایزا و درصد حضور نشانگر در ارقام تجارتی مقاوم و حساس آمده است.

جدول ۷ خلاصه نتایج تایید نشانگرهای مولکولی ناجفت منتخب پیوسته با ژن *Rz1*

ردیف	نام نشانگر	نوع نشانگر	اندازه نشانگر(bp)	درصد توافق کلی نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر	
					در ارقام حساس	در ارقام مقاوم
۱	PN3	RAPD	۸۰۰	۹۲	۸۷	۷۵
۲	PN7-1	RAPD	۱۲۸۰	۹۴	۷۶	۴۰
۳	PN7-2	RAPD	۱۳۵۰	۹۸	۹۰	۹۷
۴	PN10	RAPD	۹۰۰	۹۰	۶۰	۸۳
۵	PN11-2	RAPD	۵۰۰	۷۸	۱۰۰	۱۰۰
۶	PN13-3	RAPD	۸۳۰	۹۴	۵۹	۸۵

امیری (2003) با استفاده از نشانگر RAPD و تکنیک BSA اقدام به شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن(های) مقاومت به ریزومانیا نمود. وی برای منبع مقاومت Holly یک نشانگر جفت با پیوستگی کم و برای منبع مقاومت WB42 یک نشانگر ناجفت با پیوستگی شدید شناسایی که فاصله آن از مکان ژنی *Rz2* در منبع مقاومت WB42 حدود ۳/۶ سانتی مورگان به دست آمد. نوحی و همکاران (Nouhi et al. 2008) نیز با استفاده از روشی مشابه و با استفاده از نشانگر RAPD، موفق به شناسایی دو نشانگر به نام‌های OF-09 با اندازه ۱۱۵۰ جفت باز در وضعیت جفت و فاصله ۲۷ سانتی مورگان از ژن *Rz1* و دیگری OP-AN9 با اندازه ۶۰۰ جفت باز در وضعیت ناجفت و با فاصله ۱۳/۷ سانتی مورگان از ژن *Rz1* شدند. این نتایج عیناً توسط مصباح (Mesbah 2007) نیز ارائه شده است. نوروزی و فقهی (Norouzi and Feghhi 2009) با استفاده از تکنیک RAPD موفق به شناسائی نشانگرهای R1 و R2 به ترتیب در فواصل ۲/۳۲ و۸/۳ سانتی مورگان از ژن *Rz1* در فاز ناجفت و نشانگرهای C4 وC1 به ترتیب در فواصل ۲۱/۴ و ۲۷/۵ سانتی مورگان از ژن *Rz1* در فاز جفت شدند. اما هیچ یک از محققان فوق‌الذکر، نشانگرهای به‌دست آمده را به منظور تأیید و تکرارپذیری آن‌ها بر روی تعداد زیادی تک بوته از توده‌های مختلف مورد بررسی قرار ندادند. بنابراین در تحقیق حاضر عمده نشانگرهای ذکر شده در منابع علمی داخلی و خارجی که پیوستگی آن‌ها با ژن *RZ1* قبلا گزارش شده بود بررسی تکرارپذیری آن‌ها در چندین توده اصلاحی و رقم تجارتی حساس و مقاوم به ریزومانیا انجام گرفت که برخی از آن‌ها تایید ولی عمده آن‌ها به جای نشانگر ذکر شده در منبع اولیه تولید نشانگر(های) دیگری نمودند. علت این موضوع شاید بر طبق نظر محققان زیر قابل توجیه باشد. برای مثال گیوریو و همکاران (Giorio e al. 1997) برای تأیید ۱۰ نشانگر RAPD پیوسته با ژن مقاومت هولی که قبلاً توسط بارزن و همکاران (Barzen et al. 1997) شناسایی شده بود از یک توده در حال تفکیک برای ژن هولی استفاده و ثابت نمودند که تنها شش نشانگر از ۱۰ نشانگر مذکور در توده آن‌ها تأیید می‌شود و تکرارپذیری دارد. هم‌چنین گریمر و همکاران (Grimmer et al. 2007) در بررسی تکرارپذیری و تأیید ۱۰ نشانگر RAPD پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا که قبلاً توسط سایر محققان گزارش شده بود نتیجه گرفتند که تنها یک نشانگر در توده ایشان تکرارپذیری داشته و مورد تأیید قرار می‌گیرد و سایر نشانگرها با فواصلی که قبلاً گزارش شده بود تأیید نشدند. ایشان علت این عدم تأیید را تکرارپذیری کم برخی از باندهای RAPD و نیز تفاوت در زمینه ژنتیکی توده‌های به کار رفته در تحقیقات افراد مختلف دانستند که این تنوع می‌تواند بر الگوی باندهای RAPD مؤثر باشد. به هر حال نتیجه تحقیق حاضر منجر به معرفی تعداد زیادی نشانگر ناجفت پیوسته با ژن *RZ1* شده است که در توده‌های اصلاحی و ارقام تجارتی موجود در مؤسسه تحقیقات چغندرقند قابل استفاده می باشند.

ضریب اطمینان هر یک از نشانگرهای مولکولی به دست آمده می‌تواند همان درصد توافق کلی نشانگر با نتایج الایزا باشد. البته لازم به ذکر است که اولاً تایید نشانگرهای مذکور بر اساس میانگین چندین توده اصلاحی و یا ارقام تجارتی مقاوم و حساس چغندرقند به دست آمده است و در واقع برای اکثر نشانگرها در همه ژنوتیپ‌ها نتایج توافق و یا حضور کاملاً یکسانی به دست نیامده است بنابراین پیشنهاد می‌شود در پروژهای آتی اولاً ارتباط نشانگرهای مولکولی منتخب در این تحقیق با تعدادی ژنوتیپ که نمره آلودگی در مزرعه داشته باشند به دست آید تا بهترین نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا معرفی شوند. ثانیاً برای غربال هر توده

اصلاحی از نشانگر(هایی) استفاده نمود که بیشترین درصد همخوانی را با نتایج مقاومت (بر اساس داده‌های الایزا و یا نمره آلودگی در مزرعه) داشته‌اند. ثالثاً نشانگرهای معرفی شده در پروژه آتی به صورت نشانگرهای اختصاصی (SCAR) در آمده که جایگاه اتصال مشخص‌تری داشته باشند تا ضمن تکرارپذیری بیشتر از سهولت بیشتری نیز جهت به‌کارگیری در آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی برخوردار شوند. بدین ترتیب با انجام این مهم می‌توان نشانگرهایی را که ارزش کاربردی بیشتری دارند مشخص نمود و امیدوار بود که نشانگرهای مولکولی مذکور به توانند در پروسه تهیه رقم مقاوم به ریزومانیا، زمان و هزینه اصلاح را کاهش و دقت انتخاب تک بوته‌ها و در نتیجه سودمندی انتخاب را افزایش دهند.

اثر دز ژن مقاومت به ریزومانیا

در نشانگرهای ناجفت، گیاه مقاوم هموزیگوت (*Rz1Rz1*) با عدم حضور باند و گیاه مقاوم هتروزیگوت (*Rz1rz1*) و گیاه حساس (*rz1rz1*) به صورت حضور باند مشخص می‌شوند. با مقایسهٔ بین نتایج آزمون الایزا و آزمون مولکولی می‌توان گیاهان حساس (*rz1rz1*) را از گیاهان مقاوم هتروزیگوت (*Rz1rz1*) تشخیص داد. در این تحقیق برای هر یک از ژنوتیپ‌های (*Rz1rz1*) و (*Rz1Rz1*) که با نشانگرهای منتخب ناجفت PN3، PN_{7-1} و PN_{7-2} و PN_{13-3} مورد آزمون مولکولی RAPD قرار گرفته بودند به صورت جداگانه میانگین OD الایزا برای آن‌ها محاسبه شد. همانطور که در جدول۸ مشاهده می‌شود میانگین OD الایزا گیاهانی با ژنوتیپ هتروزیگوت (*Rz1rz1*) به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهانی با ژنوتیپ هموزیگوت غالب (*Rz1Rz1*) در کلیه نشانگرهای ناجفت مذکور می‌باشد. در نتیجه به نظر می‌رسد مقاومت بیشتر (مقدار الایزای کمتر) گیاهان هموزیگوت غالب (*Rz1Rz1*) نسبت به گیاهان هتروزیگوت (*Rz1rz1*) ناشی از اثر دز آلل ژن *Rz1* باشد. البته برای تایید نهائی این مطلب نیاز به آزمایش‌های بیشتر در شرایط آلودگی شدیدتر می‌باشد.

جدول۸ میانگین OD الایزا درگیاهان هموزیگوت و هتروزیگوت مقاوم به ریزومانیا برای نشانگرهای ناجفت منتخب

نام نشانگر	میانگین جذب الایزای بوته های *Rz1Rz1*	میانگین جذب الایزای بوته های *Rz1rz1*
PN_3	۰/۰۹۷[a]	۰/۱۴۲[b]
PN_{7-1}	۰/۰۸۹[a]	۰/۱۳۵[b]
PN_{7-2}	۰/۰۹۳[a]	۰/۱۳۶[b]
PN_{13-3}	۰/۱۲۵[a]	۰/۲۲۵[b]

ارقامی که در هر ستون اندیس مشابه دارند در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

شولتن و همکاران (Scholten et al. 1996) اثر ژن هولی را به صورت غالبیت کامل بدست آوردند به طوری که پس از تهیه گیاهان F1 حاصل تلاقی یک گیاه کاملاً حساس با یک گیاه هموزیگوت مقاوم نتیجه گرفتند که از نظر مقدار تجمع ویروس تحت شرایط آلوده گیاهان F1 هتروزیگوت با گیاهان هموزیگوت غالب جذب ویروس یکسانی دارند و بدین ترتیب اثر دز ژن را تایید نکردند.

وایزلر و همکاران (Wisler et al. 1999) در بررسی ارتباط بین فراوانی آلل غالب Rz در سطوح مختلف پلوئیدی چغندرقند ثابت نمودند که هیبرید دیپلوئید *Rzrz* مقدار جذب

الایزای کمتری نسبت به هیبرید تریپلوئید *Rzrzrz* دارد. ایشان بیان نمودند که دز آلل *Rz* (تعداد الل‌های *Rz* در یک ژنوتیپ یا فرد) و نیز فراوانی *Rz* (نسبت آلل *Rz* به آلل *rz* در یک رقم) هر دو از عوامل مهم در عملکرد کلی ارقام چغندرقند تحت شرایط آلوده به ریزومانیا می‌باشند.

قنبری و همکاران (Ghanbari et al. 1386) اثر دز ژن *Rz2* را در مزرعه تأیید نکردند و علت آن را آلودگی کم زمین آزمایشی و نیز استفاده از تنها یک سطح دیپلوئیدی چغندرقند در آزمایش خود دانستند و اظهار داشتند برای تعیین اثر دز ژن به تحقیقات بیشتر در زمین شدیداً آلوده و نیز استفاده از سطوح مختلف پلوئیدی مانند تریپلوئید و تتراپلوئید چغندرقند می باشد.

نوحی و همکاران (Nouhi et al. 2009) با استفاده از داده‌های یک نشانگر ناجفت و مقادیر جذب الایزا در یک توده F2 توانستند ژنوتیپ‌های هموزیگوت غالب را از هتروزیگوت تفکیک نمودند و میانگین جذب الایزای مشابه ای برای این دو ژنوتیپ به دست آوردند. ایشان نتیجه گرفتند که دز ژن *Rz1* تأثیری در میزان مقاومت به ریزومانیا ندارد. با این حال به نظر می‌رسد به علت آن که در تحقیق ایشان تعداد افراد هموزیگوت غالب برخلاف انتظار حدود دو برابر افراد هتروزیگوت بود (انتظار می‌رفت در یک جامعه F2 تعداد افراد هموزیگوت غالب نصف افراد هتروزیگوت باشد) شاید نتیجه‌گیری ایشان ناشی از این مسئله بوده باشد.

البتـه طبق اظهارات وایزلر و همکاران (Wisler et al. 1999) مقاومت به ریزومانیا در بیشتر ارقام تجارتی چغندرقند توسط آلل غالب *Rz* و نیز تعدادی عوامل کمی است که بر تظاهر ژن *Rz* اثر می‌گذارند. بنابراین شاید اختلاف نظری که در مورد اثر دز ژن *Rz* در منابع مختلف وجود دارد به همین مسئله بازگردد و این امر باعث می‌شود که اثبات و یا نفی اثر دز ژن کار ساده‌ای نباشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشانگرهای به دست آمده از تحقیقات قبل، روی تعدادی از توده‌های اصلاحی و ارقام تجارتی مقاوم و حساس به ریزومانیا از منشاء Holly ارزیابی شده است. بر اساس این تحقیق نشانگرهای قبلی به‌دست آمده با درجات مختلفی مورد تایید قرار گرفتند که از بین آن‌ها نشانگرهای ناجفت (نشانگر پیوسته با آلل حساسیت) PN3 و PN7-2 به ترتیب با نسبت توافق ۹۲ و ۹۸ درصد با نتایج الایزا و به ترتیب با نسبت حضور ۸۷ و ۹۰ درصد در ارقام تجارتی حساس و نسبت حضور ۷۵ و ۹۷ درصد در ارقام تجارتی مقاوم از نشانگرهای مناسب برای شناسایی آلل حساسیت *rz1* می‌باشند. بنابراین با استفاده از عدم حضور نشانگرهای ناجفت مذکور در ژنوتیپ‌های چغندرقند می‌توان بوته‌های هموزیگوت غالب احتمالی را شناسایی نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت محترم مؤسسه تحقیقات چغندرقند که امکانات اجرای این پژوهش را فراهم نموده‌اند کمال قدردانی و تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده: References:

Amiri R. The inheritance of rhizomania resistance genes and identification of DNA markers linked to them in sugar beet. Ph.D. Thesis. Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture. Tabriz Univ. 2003. (in Persian, abstract in English)

Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian SY, Ghannadha MR, Izadpanah K. The inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima,* accession WB42: Statistical comparisons with Holly-1-4. Euphytica. 2003; 132: 363-373. (in Persian, abstract in English)

Ananymus. Utilization Statistics of sugar factories of Iran. http://www.sbsi.ir/sugar_facts. 2011. (in Persian)

Barzen E, Stahl R, Fuchs E, Borchardt DC, Salamini F . Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet Rr1 allele conferring resistance to rhizomania. Mol Breed. 1997; 3:231–238.

Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology. 1977; 34: 475-483.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA minipreparation version II . Plant Molecular Biology Reporter. 1983; 1: 19-21.

Draycott AP. Sugar beet (World Agriculture Series). Wiley-Blackwell. London. 2006; pp. 496.

Ghanbari M, Amiri R, Mahmoudi B, Norouzi P, Mohammadi A. study of gene dose effect of rhizomania resistance (*Rz2*) in sugar beet. Proceeding of 5th national biotechnology congress of Iran. 2007. Nov 24-26. P. 368. (in Persian, abstract in English)

Giorio G, Gallitelli M, Cerrioro F. Molecular markers linked to rhizomania resistance in sugar beet, Beta vulgaris, from two different sources map to the same linkage groups. Plant Breeding. 1997. 116; 401-408.

Grimmer MK, Trybush S, Hanley S, Francis S, Karp A, Asher MJC. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. Theor Appl Genet. 2007; 114:1151–1160.

Izadpanah K, Hashemi P, Kamran R, Pakniat M, Sahanpour A, Masoomi M. Occurance of beard-root disease (like rhizomania) in Fars province. Plant Pathology Journal. 1996; 23: 200-206. (in Persian, abstract in English)

Keskin B. Polymyxa betae n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Arch Mikrobiol. 1964; 49: 348– 374.

Lein JC, Asbach K, Tian Y, Schulte D, Li C, Koch G, Jung C, Cai D. Resistance gene analogues are clustered on chromosome 3 of sugar beet and cosegregate with QTL for rhizomania resistance. Genome. 2007; 50: 61-71.

Mesbah M. Identification of molecular markers linked to rhizomania resistance genes for evaluation of sugar beet germplasm. Final report of project. Sugar Beet Seed Institute. 2007. pp. 44. (in Persian, abstract in English)

Norouzi P. Identification of molecular markers linked to rhizomania resistance genes from Holly source. Final report of project. Sugar Beet Seed Institute. 2008. pp. 67. (in Persian, abstract in English)

Norouzi P, Feghhi SMA. Identification of some RAPD molecular markers linked to rhizomania resistance gene in sugar beet. Proceeding of 6th national biotechnology congress of Iran. 2009. Aug 13-15. P. 112. (in Persian, abstract in English)

Nouhi A, Amiri R, Haghnazari A, Saba J, Mesbah M. Tagging of resistance gene(s) to rhizomania disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). African Journal of Biotechnology. 2008; 7(4): 430-433.

Nouhi A A, Amiri R, Haghnazari A, Saba J, Mesbah M. Use of molecular marker for assay gene dosage resistant gene to rhizomania disease (*Rz1*) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Asian Journal of Biotechnology. 2009; 1(1): 37-41.

Pelsy F, Merdinoglu D. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. Plant Breeding. 1996; 115: 371-377.

Scholten OE, Jansen RC, Paul Keizer LC, De Bock TSM, Lang W. Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. Euphytica. 1996; 91: 331-339.

Scholten OE, Klein-Lankhosrst RM, Esselink DG, De Boek SM, Lange W. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta* accessions. Theor Appl Genet. 1997; 94:123-130.

Scholten OE, De Bock TSM, Klein-Lankhorst RM, Lange W. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris*, conferred by a second gene for resistance. Theor Appl Genet. 1999; 99: 740-746.

Scholten OE, Lange W. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica. 2000; 112: 219-231.

Tamada T. Beet Necrotic Yellow Vein Virus. C.M.I./ A.A.B. Descriptions of plant viruses, 1975. No. 144.

Toodehfallah M, Arjomand N, Mahmoudi B. Investigation of infestation and dispersion of rhizomania disease of sugar beet in Iran. Proceeding of 14th plant protection congress of Iran. Esfahan Technical Univ. Esfahan. 2000; P: 72. (in Persian)

Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Liu HY, Duffus JE. Specificity of TAS-ELISA for beet necrotic yellow vein virus and its application for determining rhizomania resistance in field grown sugar beets. Plant Dis. 1999; 83: 864-870.