مجله زارعت و اصلاح نباتات
جلد ۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحات ۱۸۳-۱۷۳

بررسی تکرارپذیری یک نشانگر مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا و غربال ژنوتیپ‌های مقاوم هموزیگوت در چغندرقند

Repitability of a molecular marker linked with rhizomania resistance gene and screening for resistant homozygote genotypes in sugar beet

صدیقه هراسانی[۱]، پیمان نوروزی[۲]، خداداد مصطفوی[۳*]، محسن آقایی زاده[۲]

چکیده

حضور یک نشانگر مولکولی ناجفت رپید، موسوم به AM2، پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا، بر روی DNA تک بوته‌های یک توده اصلاحی بدست آمده از تلاقی گونه وحشی بتا ماریتیما (دارای ژن مقاومت Rz2) با چغندرقند موسوم به توده F2BC1 بررسی گردید. برای این کار ابتدا حدود ۱۱۶۰ بذر از توده مورد نظر در گلخانه کشت شد و پس از تهیه گیاهان یک ماهه، حدود ۱۰۰ گیاهچه به منظور ارزیابی مقاومت فنوتیپی، به خاک آلوده به ریزومانیا در گلخانه منتقل شد و به مدت دو ماه در این خاک نگه‌داری شدند. سپس تعیین کمیت و کیفیت DNAهای استخراجی با روش اسپکتروفتومتری انجام شد. سپس آزمون RAPD-PCR بر روی نمونه‌های گیاهی با آغازگر مربوطه انجام گرفت. پس از الکتروفورز محصولات واکنش در ژل آگارز و رنگ آمیزی ژل و مشاهده‌ی الگوی باندی، حضور و عدم حضور نشانگر در تک بوته‌ها مشخص گردید. در مرحله بعد میزان مقاومت گیاهان کشت شده در خاک آلوده بر اساس غلظت ویروس در داخل ریشه گیاه با آزمون سرولوژیکی الایزا در آزمایشگاه تعیین گردید. سپس رابطه و میزان همبستگی و درجه توافق بین نشانگر (بر اساس داده‌های مولکولی) و مقاومت (بر اساس داده‌های الایزا) در تک بوته‌های توده مورد نظر مشخص شد. نتایج نشان داد که میانگین مقادیر جذب الایزای ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزیگوت غالب، فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد. همچنین نتایج مقایسه میانگین برای صفت درصد حضور نشانگر بصورت طرح کاملاً تصادفی متعادل در چهار ژنوتیپ شامل توده F2BC1 (دارای ژن مقاومت Rz2)، رجینا (رقم شاهد حساس به ریزومانیا)، پائولتا (رقم شاهد مقاوم به ریزومانیا) و توده اصلاحی S1 (دارای ژن مقاومت Rz1) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود ندارد و تکرارپذیری نشانگر ناجفت AM2 در ژنوتیپ‌های مختلف تأیید گردید.

واژه‌های کلیدی: چغندر قند، ریزومانیا، نشانگر مولکولی، رپید.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، البرز، ایران
۲- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران.
* مکاتبه کننده: mostafavi@kiau.ac.ir

مقدمه

مهمترین بیماری که گیاه چغندرقند را تهدید می کند ریزومانیا[1] می‌باشد که زراعت این گیاه را مختل نموده است. این بیماری که از مخرب ترین بیماری‌های چغندرقند است، می‌تواند حتی تا صد در صد محصول این گیاه را از بین ببرد. این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۵ از فارس گزارش شد (ایزدپناه و همکاران، ۱۳۷۵). متعاقب آن بیماری از اکثر مناطق چغندرکاری کشور گزارش گردید (توده فلاح و ممکاران، ۱۳۷۹). ویروس عامل بیماری ریزومانیا یا BNY-VV (Tamada, 1975) توسط قارچی بنام پلی میکسا بتا کسکین[2] منتقل می‌شود (Keskin., 1964). تنها راه حفاظت محصول چغندر قند در مزرعهٔ آلوده به BNYVV، کشت ارقام مقاوم است. عمدتا دو ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندر قند شناسایی شده‌اند که از منابع مختلف منشأ گرفته‌اند و بصورت Rz1 و Rz2 نامگذاری شده‌اند (Scholten & Lange, 2000). با توجه به آنکه روش‌های ارزیابی کلاسیک گزینش مقاومت به بیماری از نوع فنوتیپی بوده و وابسته به شرایط محیطی و یکنواختی عامل آلوده کننده هستند و در فصل خاصی از سال انجام می‌گیرند و نیز بعضی گیاهان از عامل آلوده کننده به نحوی می‌گریزند و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی، به عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می‌توان گیاهان در بردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. بنابراین نشانگرهای مولکولی DNA می‌توانند ابزاری مفید برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم باشند و باعث صرفه جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب گردند (نوروزی ۱۳۸۷). پلسی و مردینوگلو از روش BSA برای شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در منبع Holly استفاده نمودند (Pelsy and Merdinoglu, 1996). از ۱۶۰ آغازگر استفاده شد که ۱۹ آغازگر ۴۴ نشانگر چندشکل تولید نمودند که در ۹ گروه پیوستگی طبقه بندی شدند. شولتن و همکاران نام Rz1 را برای ژن Holly و نام Rz2 را برای ژن (های) WB42 پیشنهاد نمودند (Scholten et al., 1997, 1999). امیری 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، ۱۳۸۲). امیری و همکاران با بررسی وراثت مقاومت به بیماری ریزومانیای غغندرقند دریافتند که ژن‌های مقاومت در منابع Hol-ly و WB42 غیر آللی و به‌صورت پیوسته می‌باشند (Amiri et al., 2003). امیری (۱۳۸۲) 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 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 بدست آورد (امیری، ۱۳۸۲). نوحی و همکاران 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 (Nouhi et al., 2008). نتایج مشابهی توسط مصباح و همکاران (۱۳۸۶) نیز گزارش شده است. نوروزی (۱۳۸۷) و نوروزی و فقهی (۱۳۸۸) 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 و C1 به ترتیب در فواصل ۲۱/۴ و ۲۷/۵ سانتی مورگان از ژن Rz1 در فاز جفت شدند.

هدف از این تحقیق بررسی تکرار پذیری وتایید یک نشانگر مولکولی موسوم به AM2 (Amiri et al., 2009) پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیای چغندرقند از منبع بتا ماریتیما از طریق مقایسه نتایج نشانگر با نتایج آزمون الایزا و تعیین درصد حضور نشانگر در توده‌های اصلاحی و ارقام تجاری مقاوم و

1- Rhizomania

2- Polymyxa beta keskin

حساس چغندرقند برای ارزیابی سریع ژرم پلاسم بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور نمونه‌های گیاهی در گلخانه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر جغندر قند کرج کشت شد. در این تحقیق حضور یک نشانگر ناجفت پیوسته با ژن Rz2 مقاومت به ریزومانیا موسوم به AM2، بر روی DNAی استخراج شده در ۱۱۶۰ تک بوته ی یک توده اصلاحی بدست آمده از تلاقی گونه وحشی بتا ماریتیما (دارای ژن مقاومت Rz2) با چغندرقند موسوم به توده F2BC1، رجینا (رقم شاهد حساس به ریزومانیا)، پائولتا (رقم شاهد مقاوم به ریزومانیا) و توده اصلاحی S1 (دارای ژن مقاومت Rz1) بررسی گردید. همچنین پس از تهیه گیاهان یک ماهه، ۱۰۹ گیاهچه از توده F2BC1 و ۷۶ گیاهچه از چهار ژنوتیپ رجینا و رسول و پائولتا و توده اصلاحی S1 به منظور ارزیابی مقاومت فنوتیپی، به خاک آلوده به ریزومانیا در گلخانه منتقل شد و به مدت دو ماه در این خاک نگه داری شدند. سپس میزان مقاومت گیاهان کشت شده در خاک آلوده بر اساس غلظت ویروس در داخل ریشه گیاه با آزمون سرولوژیکی الایزا در آزمایشگاه تعیین گردید.

آزمون الایزا (ELISA) برای اندازه گیری غلظت ویروس BNYVV: ابتدا بافرهای زیر تهیه گردید.

– تهیه بافر پوششی: ۱/۵۹ گرم کربنات سدیم (Na2co3) را در آب مقطر حل کرده سپس ۲/۹۳ گرم کربنات هیدروژن سدیم (NaHCO3) به آن اضافه شد. جهت ماندگاری بیشتر این محلول مقدار ۰/۲ گرم سدیم آزید داخل محلول ریخته شد. حجم کل بافر را نزدیک به یک لیتر رسانده سپس pH با استفاده از HCl در ۹/۸ تنظیم گردید. در انتها محلول به حجم یک لیتر رسانده شد. توجه: ماده سدیم آزید (NaN3) بسیار خطرناک و سرطان زا است.

– تهیه بافر PBS10X: ۸۰ گرم کلرید سدیم (NaCl)، ۲ گرم KH2PO4، ۲۹ گرم Na2HPO4، 2H2O و ۲ گرم کلرید پتاسیم (KCl) را در یک بشر ریخته و سپس مقداری آب مقطر به آن اضافه شد. پس از حل شدن مقدار ۰/۲ گرم سدیم آزید جهت ماندگاری بیشتر به آن اضافه کرده پس از تنظیم pH محلول در ۷/۴، حجم محلول به یک لیتر رسانده شد.

– تهیه بافر نمونه: ۱۰۰ میلی لیتر از بافر PBS10X را در ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده سپس ۲۰ گرم PVP به آن اضافه گردید. پس از حل شدن کامل PVP با استفاده از همزن، ۰/۵ میلی لیتر از Tween20 اضافه کرده در انتها حجم محلول به یک لیتر رسانده شد.

– تهیه بافر شستشو: ۱۰۰ میلی لیتر از PBS10X و ۰/۵ میلی‌لیتر Tween20 با استفاده از آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

– تهیه بافر دی اتانول آمین[1]: ۹/۷ میلی لیتر دی اتانول آمین را با استفاده از آب مقطر نزدیک به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده سپس pH محلول با استفاده از HCl در ۹/۸ تنظیم و در انتها حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

مراحل انجام DAS-ELISA: اندازه گیری غلظت ویروس در ریشه چه گیاهان با استفاده از آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) مطابق روش معمول کلارک[2]و آدامز[3] (۱۹۷۷)، که در آزمایشگاه گیاهپزشکی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج بهینه‌سازی شده بود انجام شد (Amiri et al., 2003). آنتی‌سرم‌ها و عصاره برگ‌های Chenopodium quinoa آلوده به BNYVV به عنوان کنترل مثبت[4] از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه گردید. جزئیات روش الایزا به شرح زیر انجام گرفت: پس از خارج سازی گیاهچه‌ها از مخلوط خاک آلوده و شستشوی کامل ریشه‌چه‌های آنها، ۰/۱ گرم از ریشه‌چه هر گیاه همراه با یک میلی لیتر از بافر نمونه در دستگاه عصاره گیری به خوبی له شده و عصاره نمونه تهیه شده تا زمان آزمون الایزا در داخل

1- Diethanolamine
2- Clark
3- Adams
4- Positive control

لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری درب‌دار، داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهدای گردید. برای انجام آزمون الایزا ابتدا آنتی بادی با نسبت یک در هزار در بافر پوششی رقیق شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق آنتی بادی به هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا اضافه گردید. برای کاهش اثرهای حاشیه‌ای ردیف خارجی پلیت‌ها با بافر پوششی پرگردید و فقط از ۶۰ چاهک داخلی پلیت‌ها برای آزمون الایزا استفاده شد (امیری، ۱۳۸۲؛, Paul at al., 1992). سپس پلیت‌ها به مدت ۳/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهدای شدند. پس از این مدت، بافر پوششی موجود در پلیت‌ها به‌طور کامل خالی شده و هر پلیت سه بار و هر بار به مدت سه دقیقه توسط بافر شستشو، شتسشو گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۵-۴ دقیقه به‌صورت در باز در دمای اتاق نگهداری شدند تا داخل چاهک‌ها خشک شوند. برای آماده سازی عصاره، نمونه‌ها از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد به یخچال منتقل شده و پس از باز شدن یخ آنها، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه به چاهک‌های مربوطه اضافه گردید. در هر پلیت شش چاهک برای کنترل منفی (عصاره گیاه سالم)، یک چاهک برای کنترل مثبت (عصاره برگهای Chenopodium quinoa آلوده به BNYVV) و دو چاهک برای نمونه فاقد عصاره گیاهی (Blank) در نظر گرفته شد. در این مرحله به ردیف‌های خارجی پلیت‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه گردید. پس از اضافه نمودن نمونه‌ها (آنتی ژن)، پلیت‌ها در طی شب در یخچال در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در روز بعد، بافر موجود در پلیت‌ها به‌طور کامل خالی شده و هر پلیت سه بار و هر بار به مدت سه دقیقه با بافر شستشو شسته شد. در این مرحله بعد از ۵-۴ دقیقه، آنتی بادی کانژوگیت[1] با نسبت یک در هزار در بافر نمونه رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق آنتی بادی کانژوگیت به هر چاهک اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۳/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شده و متعاقب آن یه بار با بافر شستشو شسته شدند. پس از خشک شدن پلیت‌ها، به هر چاهک ۱۰۰ میکرلیتر بافر تازه دی اتانول آمین حاوی یک mg/ml سوبسترا اضافه گردیده و در ردیف‌های خارجی پلیت‌ها نیز، هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه پر شد. سپس پلیت‌ها در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شدند. واکنش آنزیمی با دستگاه پلیت خوان (ELISA Reader, Labsystem,Multiskan EX-355) در nm ۴۰۵ خوانده شد. در نهایت دو برابر میانگین مقادیر جذب نمونه‌های سالم به عنوان آستانه تفکیک گیاهان مقاوم از حساس در نظر گرفته شد.

(Amiri et al., 2003)

استخراج DNA: از گیاهان یک‌ماهه، استخراج DNA ژنومی با روش تیر یافته دلاپورتا و همکاران انجام شد (Dellaporta et al., 1983). سپس DNAی استخراج شده در بافر TE حل شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز مشخص شد.

آزمون RAPD: واکنش زنجیره پلی مراز 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 ng/ µl ۵۰، ۲/۵ میکرولیتر ۱۰x buffer، ۲ میکرولیتر dNTP ۲/۵ میلی مولار، ۱/۸ میکرولیتر MgCl2 با غلظت ۲۵ میلی مولار، ۱ میکرولیتر با غلظت ng/µl ۳۰ از آغازگر AM2، ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی مراز بود. واکنش زنجیره پلی مرازبرای آزمون RAPD در دستگاه ترموسایکلر با مراحل زیر صورت گرفت: ۵ دقیقه واسرشت سازی اولیه در $94^{\circ}C$، ۴۰ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$، اتصال به مدت ۴۰ ثانیه در دمای $35^{\circ}C$، توسعه به مدت ۹۰ ثانیه در دمای $72^{\circ}C$ و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای $72^{\circ}C$ برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش. سپس الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰، رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و عکس برداری در دستگاه مستند ساز

1- Conjugate

ژل انجام گرفت. در نهایت الگوی نواربندی ژنوتیپ‌ها روی ژل مشخص شد.

محاسبات آماری

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

$$\text{درصد توافق نتایج لایزا با داده های مولکولی} = \frac{\text{تعداد نمونه هایی که نتایج مولکولی آن ها با آزمون لایزا توافق داشته}}{\text{تعداد کل نمونه های مورد آزمون}}$$

همچنین برای مقایسه نسبت مشاهده شده نشانگر با نسبت موردانتظار مندلی در توده اصلاحی از آزمون مربع کای تصحیح شده استفاده گردید.

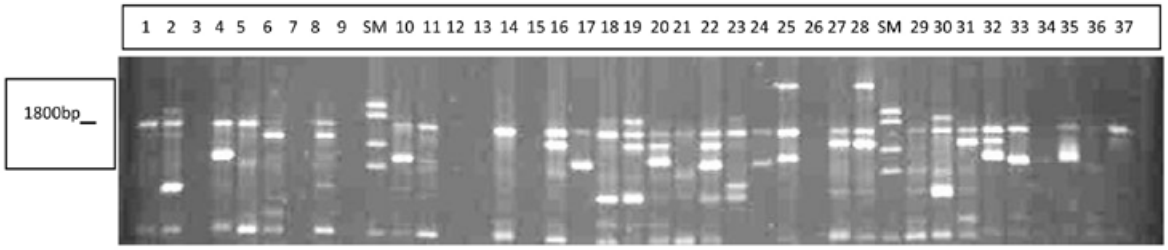
برای تعیین اثر دز ژن RZ1 در ژنوتیپ‌های مقاوم از طرح کاملاً تصادفی نامتعادل بر اساس مقایسه داده‌های الایزا ونتایج مولکولی استفاده گردید. داده‌های مربوط به این آزمون جهت تجزیه و تحلیل وارد نرم افزار Excel شد. به دلیل نرمال نبودن داده‌ها و وجود همبستگی بین میانگین و واریانس ابتدا به تمامی داده‌ها عدد یک اضافه شد، سپس از تمامی داده‌ها لگاریتم طبیعی گرفته شد، بدین ترتیب از غیر یکنواختی داده‌ها به میزان زیادی کاسته شد، سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS مورد آنالیز و تجزیه واریانس به‌صورت طرح کاملا تصادفی نامتعادل قرار گرفت.

نتایج و بحث

استخراج DNA: DNA ژنومی استخراجی در ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۶۰ ولت اسمیر کمی داشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش استفاده شده برای استخراج DNA از بافت برگی روشی ساده، سریع و مناسب بوده و DNA استخراج شده از کیفیت مطلوبی برخوردار است. کمیت DNA نیز برای تعدادی از تک بوته‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد که پس از تایید بهینه بودن شرایط استخراج به دلیل تعداد زیاد نمونه‌ها بسته به حجم رسوب DNA، رقیق سازی در بافر TE به میزان ۲۵۰-۳۰ میکرولیتر انجام شد.

واکنش RAPD-PCR: برای ایجاد شرایط مناسب واکنش RAPD-PCR ابتدا غلظت مناسب نمک منیزیم، آغازگر و DNA با استفاده از آزمون شیب غلظت تعیین گردید که غلظت مطلوب برای نمک منیزیم ۱/۸ میلی مولار بود. بیش از این مقدار باعث ایجاد باندهای Smear و کمتر از آن منجربه عدم تکثیر برخی قطعات در چرخه اولیه واکنش و در نتیجه از دست رفتن برخی چند شکلی‌های احتمالی شد. حجم DNA مورد نیاز در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری ۱/۵ میکرولیتر با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. بیش از این مقدار اثر کم و غلظت‌های بالاتر اثر بازدارنده در تکثیر داشتند. همچنین غلظت‌های پایین تر منجربه از دست رفتن برخی چندشکلی‌ها شد. دو میکرولیتر dNTP و حجم مورد نیاز از آغازگر ۱ میکرولیتر با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA Polymerase، و ۲/۵ میکرولیتر یاربه10Xbuffer هر واکنش بهینه شد.

الکتروفورز محصولات RAPD-PCR در ژل آگارز ۱ درصد، رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و عکس برداری در دستگاه مستند ساز ژل انجام گرفت (شکل ۱). سپس درصد حضور نشانگر در تک بوته‌ها به تفکیک هر ژنوتیپ محاسبه شد.



شکل۱- نیمرخ تهیه شده از نشانگر ناجفتAM2، ستون ده و سی از سمت چپ معرف نشانگر تعیین اندازه DNA و مابقی ستونها نشان دهنده ژنوتیپ‌های توده F2BC1

Fig 1- profile from Am2 marker, 10 and 30 column from left display size marker, others indicating for F2BC2 geotypes

بررسی توافق نتایج نشانگر AM2 با الایزا:

امیری در سال ۱۳۸۲ با استفاده از تکنیک RAPD موفق گردید نشانگر ناجفت AM2 با پیوستگی شدید (با فاصله ۳/۶ سانتی مورگان) را برای مکان ژنی RZ2 حاصل از منبع WB42 بدست آورد. برای تأیید نشانگر ابتدا ۱۸۵ تک بوته با ژنوتیپ‌های توده F2BC1 (دارای ژن مقاومت Rz2)، رجینا (رقم شاهد حساس به ریزومانیا)، پائولتا (رقم شاهد مقاوم به ریزومانیا) و توده اصلاحی S1 (دارای ژن مقاومت Rz1) و رسول (رقم حساس به ریزومانیا) موردآزمون مولکولی قرار گرفت. سپس درصد حضور نشانگر مشخص شد بعد از آن میزان مقاومت گیاهان کشت شده در خاک آلوده بر اساس غلظت ویروس در داخل ریشه گیاه با آزمون سرولوژیکی الایزا در آزمایشگاه تعیین گردید. بدین ترتیب بوته‌های مقاوم و حساس مشخص شد. سپس رابطه و میزان همبستگی و درجه توافق بین نشانگر (بر اساس داده‌های مولکولی) و مقاومت (بر اساس داده‌های الایزا) در تک بوته‌های توده موردنظر با نرم افزار Excel مشخص شد (جدول ۱).

همانطور که مشاهده می‌شود درصد توافق نشانگر با الایزا در ژنوتیپ‌های رجینا و رسول و پائولتا و توده‌ی اصلاحی S1، صد در صد و در توده F2BC1 مقدار ۹۸ درصد می‌باشد. بدین ترتیب تکرارپذیری نشانگر مذکور در جمعیت‌های مختلف چغندرقند تایید می‌گردد.

جدول۱- درصد توافق نشانگر AM2 با الایزا و درصد حضور نشانگر

Table 1- Agreement percent between AM2 marker with ELISA and marker presence

ردیف Row	نام ژنوتیپ Genotype name	تعداد بوته بررسی شده Plant No	درصد توافق نشانگرAM2 با الایزا AM2 and ELISA agreement (%)	درصد حضور نشانگر Marker presence (%)
1	حساس رجینا	28	100%	96%
2	حساس رسول	4	100%	100%
3	مقاوم پائولتا	26	100%	92%
4	توده F_2BC_1	109	98%	90%
5	توده S1	18	100%	100%

غربال بوته‌های هموزیگوت غالب در توده اصلاحی بر اساس نشانگر ناجفت AM2:

پس از تایید نشانگر مذکور از آن جهت غربال بوته‌های هموزیگوت غالب در توده F2BC1 استفاده شد. بدین ترتیب که بوته‌های فاقد نشانگر ناجفت به منزله عدم آلل حساس و در نتیجه هموزیگوت غالب بودند. درصد بوته‌های هموزیگوت غالب بر اساس نشانگر با درصد مورد انتظار در جامعه مذکور که معادل یک شانزدهم بود مورد مقایسه آماری با آزمون مربع کای شدند که نتایج آن در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- نتیجه کای اسکور برای درصد حضور نشانگر در توده F2BC1

Table 2- chi square results for marker presence in F2BC1

تعداد گیاهان	نسبت مورد انتظار	تعداد مورد انتظار	تعداد مشاهده شده	کای اسکور
Plant No	Expected Ratio	Expected No	Observed No	X^2
1160	1:16	72	58	2.53ns

ns: غیر معنی دار ns: not significant

کای‌اسکور نشان داد که بین نسبت مورد انتظار برای وراثت صفت مونوهیبریدیسم و نسبت ژنوتیپ هموزیگوت غالب (Rz2Rz2) مشاهده شده تفاوت معنی داری وجود ندارد. لذا جامعه آماری بررسی شده دارای تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد و نسبت تفکیک نشانگر AM2 با نسبت تفکیک ژن RZ2 مطابقت دارد. یعنی نوترکیبی بین نشانگر و ژن کم می‌باشد.

امیری (۱۳۸۲) 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 بدست آمد. نوحی و همکاران 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 (Nouhi et al., 2008). نوروزی و فقهی (۱۳۸۸) با استفاده از تکنیک RAPD موفق به شناسائی نشانگرهای R1 و R2 به ترتیب در فواصل ۲/۳۲ و ۸/۳ سانتی مورگان از ژن Rz1 در فاز ناجفت و نشانگرهای C4 و C1 به ترتیب در فواصل ۲۱/۴ و ۲۷/۵ سانتی مورگان از ژن Rz1 در فاز جفت شدند. اما هیچیک از محققان فوق الذکر، نشانگرهای بدست آمده را به منظور تایید و تکرار پذیری 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 بجای 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 et al., 1997) برای تایید ۱۰ نشانگر RAPD پیوسته با ژن مقاومت هولی که قبلا 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 تایید می‌شود و تکرارپذیری دارد. همچنین گریمر و همکاران (Grimmer et al., 2007) در بررسی تکرارپذیری و تایید ۱۰ نشانگر RAPD پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا که قبلا توسط سایر محققان گزارش شده بود نتیجه گرفتند که تنها

یک نشانگر در توده ایشان تکرارپذیری داشته و مورد تایید قرار می‌گیرد و سایر نشانگرها با فواصلی که قبلا گزارش شده بود تایید نشدند. ایشان علت این عدم تایید 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 موثر باشد. بهر حال نتیجه تحقیق حاضر منجر به معرفی تعداد زیادی نشانگر جفت و ناجفت پیوسته با ژن RZ1 شده است که در توده‌های اصلاحی و ارقام تجارتی موجود در موسسه تحقیقات چغندرقند قابل استفاده می‌باشند.

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) به‌صورت 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. نشانگر ناجفت AM2 برای ژن Rz2 شناسایی شده که از ترکیب اطلاعات مربوط به این نشانگر و نتایج آزمون الایزا، امکان تفکیک ژنوتیپ‌های Rz2 Rz2 و Rz2 rz2 از یکدیگر فراهم شد. بر این اساس از تعداد کل بوته‌های مقاومی که به وسیله این نشانگر مورد بررسی قرار گرفتند، ۵ بوته هموزیگوت غالب و ۷۵ بوته هتروزیگوت بودند. که نتایج آن در جدول ۳ ارائه شده است. همان طوری که ملاحظه می‌گردد، میانگین مقادیر جذب الایزای ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزیگوت غالب فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

جدول۳- نتایج تجزیه واریانس اثر دز ژنی

Table 3- Analysis of variance for gene dose effect

منابع تغییرات S. O. V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
ژنوتیپ Genotype	1	0.0041ns
خطا Error	78	0.0049ns
کل Total	79	

ns: غیر معنی دار ns: not significant

شولتن و همکاران اثر ژن هولی را به‌صورت غالبیت کامل بدست آوردند به‌طوری که پس از تهیه گیاهان F1 حاصل تلاقی یک گیاه کاملا 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 (Scholten et al., 1996).

نوحی و همکاران 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 مشابه‌ای برای این دو ژنوتیپ بدست آوردند. ایشان نتیجه گرفتند که دز ژن Rz1 تاثیری در میزان مقاومت به ریزومانیا ندارد (Nouhi et al., 2009). با این حال به نظر می‌رسد به علت آنکه در تحقیق ایشان تعداد افراد هموزیگوت غالب بر خلاف انتظار حدود دو برابر افراد هتروزیگوت بود (انتظار می‌رفت در یک جامعه F2 تعداد افراد هموزیگوت غالب نصف افراد هتروزیگوت باشد) شاید نتیجه گیری ایشان ناشی از این مسئله بوده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مدیریت مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند به خاطر فراهم نمودن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

فهرست منابع References

امیری، ر.، ۱۳۸۲. وراثت ژن (های) عامل مقاومت به ریزومانیا و شناسایی نشانگرهای DNAی پیوسته با آنها در چغندر قند. پایان نامه دکتری تخصصی اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

ایزدپناه، ک.، هاشمی، پ.، کامران، ر.، پاک نیت، م.، سهندپور، آ. و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه ریشی (شبه Rhizomania) در فارس. مجله بیماری گیاهی، جلد۳۲، صفحات: ۲۰۶-۲۰۰.

توده فلاح، م.، ارجمندی، ن. و محمودی، ب. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت آلودگی و پراکنش بیماری ریزومانیا (ریشه گنایی) چغندر قند در ایران. ۱۳۷۹. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. جلد دوم، صفحه ۷۲.

قنبری م.، امیری ر.، محمودی س.ب.، نوروزی پ.، محمدی ع. ۱۳۸۶. مطالعه اثر دز ژن مقاومت به بیماری ریزومانیا (RZ2) در چغندرقند. خلاصه مقالات پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران. صفحه ۳۶۸.

مصباح، م. ۱۳۸۶. شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت به ریزومانیا جهت ارزیابی سریع ژرم پلاسم چغندرقند. گزارش نهایی طرح. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند. ۴۴صفحه.

نوروزی، پ. ۱۳۸۷. شناسائی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن یا ژنهای مقاومت به ریزومانیا از منبع Holly. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند. شماره ثبت ۸۷/۳۵۴ ۶۷ صفحه.

نوروزی، پ. و فقهی. س. م. ا. ۱۳۸۸. شناسایی چند نشانگر مولکولی RAPD پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند. ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران (۲۴-۲۲ مرداد ۱۳۸۸).

Amiri, R., Moghaddam, M., Mesbah, M., Sadeghian, S. Y., Ghannadha, M. R. & Izadpanah, K. 2003. 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 132: 363-373.

Barzen E, Mechelke W, Ritter E, Seitzer JF, Salamini F.1992. RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogermy and hypocotyl colour. Plant J. 2:601–611.

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

Clark, M. F. & Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

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

Draycott, A.P. 2006. Sugar beet. Blackwell, London.

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

Grimmer, M. K., S. Trybush, S. Hanley, S. A. Francis, A. Karp, M. J. C. Asher. 2007. 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. 114:1151–1160.

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

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

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

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

Paul H, Henken B, Alderlieste MFJ (1992). A greenhouse test for screening sugar beet (Beta vulgaris L.) for resistance to Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV). Neth. J. Plant Pathol. 98:65–75.

Pelsy, F. & Merdinoglu, D. 1996. 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 115, 371-377.

Scholten, O. E., Jansen, R. C., Paul Keizer, L. C., De Bock, Th. S. M. & Lang, W. 1996. Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta vulgaris. Euphytica 91: 331-339.

Scholten, O. E , Klein-Lankhosrst, R. M. Esselink, D. G. De Boek, S. M. and Lange W. 1997. 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. 94:123-130.

Scholten, O.E., De Bock, T.S.M., Klein-Lankhorst, R.M. & Lange, W. 1999. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta vulgaris, conferred by a second gene for resistance. Theor. Appl. Genet. 99, 740-746.

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

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

Wisler, G. C., Lewellen, R. T., Sears, J. L., Liu, H. Y. & Duffus, J. E. 1999. Specificity of TAS-ELISA for beet necrotic yellow vein virus and its application for determining rhizomania resistance in field grown sugar beets. Plant Dis. 83: 864-870.

Amiri, R., M. Mesbah, M. Moghaddan, M. R.. Bihamta, S.A. Mohammadi and P. Norouzi. (2009). A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in Beta vulgaris. Biologia Plantarum. 53 (1): 112-119.

Amiri R., Moghaddam M., Mesbah M., Sadeghian SY., Ghannadha MR. and Izadpanah K. 2003. The inher-

itance of resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in B. vulgaris subsp. maritima, accession WB42: Statistical comparisons with Holly-1-4. Euphytica. 132: 363-373.

Amiri, R. 1382a. Genetic studies on resistance to Rhizomania in S1, S2 and BC generations. Final report of research project. Sugar beet seed institute, Karaj, Iran. 21pp.

Amiri, R. 1382b. Identification of molecular markers linked to Rhizomania resistance gene for rapid screening of beet germplasm. Final report of research project. Sugar beet seed institute, Karaj, Iran. 32pp.

Barzen, E., R. Stahal, E. Fuchs, D. C. Borchardt & F. Salamini. 1997. Development of coupling- repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet Rr1 allele conferring resistance to rhizomania. Mol.Breeding 3: 231-238.

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

Norouzi, P. 1387. Identification of molecular markers linked to Rhizomania resistance gene (s) from Holly. Final report of research project. Sugar beet seed institute, Karaj, Iran. 67pp.

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

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

Scholten, O.E., Th.S.M.De Bock ,Klein – Lankhorst & W.Lange. 1999. Inberitance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta Vulgaris conferred by a second gene for resistance. Theor. Appl.Genet.99:740-746.

Scholten, O,E., R.M. Klein – Lankhorst, D.G. Esselink, Th.S.M.De Bock & W. Longe. 1997. 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. 94:123-130.

Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. 1980. Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach. McGraw-Hill, Inc., New York.