دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارتباط بین یک نشان‌گر مولکولی ناجفت با شدت آلودگی به ریزومانیا در مزرعه و غلظت ویروس در ریشه چغندرقند

پیمان نوروزی[1]، مژده کاکوئی‌نژاد[2]، سید باقر محمودی[3] و سعید دارابی[4]

۱- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، (نویسنده مسوول: norouzi@sbsi.ir)
۲ و ۳- پژوهشگر و دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
۴- پژوهشگر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس
تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۲

چکیده

هدف از تحقیق حاضر، تعیین رابطه بین یک نشان‌گر مولکولی ناجفت با مقاومت به ریزومانیا در شرایط مزرعه آلوده و نیز با غلظت ویروس در ریشه چغندرقند (مقادیر جذب الایزا) بوده است. برای این کار ژنوتیپ‌های مورد نظر در منطقه آلوده شیراز در قالب طرح بلوک کامل تصادفی کشت شدند. در اواخر فصل ریشه‌ها برداشت شده و نمره آلودگی ریشه برای هر یک از کرت‌ها و نیز برای سه بوته در هر کرت از ۱۶ ژنوتیپ منتخب مشخص شد. هم‌چنین از گیاهان منتخب نمونه‌برداری برگ و ریشه صورت گرفت. سپس در آزمایشگاه از ریشه گیاهان عصاره‌گیری و آزمون الایزا و از برگ گیاهان، استخراج DNA و آزمون مولکولی نشان‌گر انجام گرفت. در آزمون مولکولی، آغازگرهای مربوط به یک نشان‌گر ناجفت روی DNA تک بوته‌ها با روش RAPD-PCR آزمون و حضور و عدم حضور نشان‌گر در تک بوته‌ها مشخص شد. سپس تجزیه واریانس و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و نیز تجزیه خوشه‌ای آن‌ها برای صفات مقاومت مزرعه‌ای و عدد جذب الایزا انجام شد. ژنوتیپ‌ها بر اساس مقادیر جذب الایزا و بر اساس شدت آلودگی ریشه در مزرعه به چهار گروه مقاوم، نسبتاً مقاوم، نسبتاً حساس و کاملاً حساس دسته‌بندی شدند. در مرحله بعد ارتباط بین نتایج نشان‌گر، نتایج الایزا و شدت آلودگی ریشه در مزرعه به صورت مقایسه جفتی بررسی شد. نتایج نشان داد که در توده‌های اصلاحی منتخب میانگین توافق نشان‌گر با الایزا ۸۵ درصد، نشان‌گر با مقاومت مزرعه‌ای ۸۶ درصد و الایزا با مقاومت مزرعه‌ای ۸۰ درصد می‌باشد. در مجموع داده‌های نشان‌گر مولکولی، الایزا و مزرعه یک‌دیگر را تأیید نمودند.

واژه‌های کلیدی:چغندرقند، مقاومت، RAPD، ریزومانیا، نشان‌گر ناجفت

مقدمه

چغندرقند یکی از دو محصول مهم تأمین‌کنندهٔ قند در جهان می‌باشد. سطح کشت جهانی آن بالغ بر ۹ میلیون هکتار است. در حال حاضر بیش از ۳۴ میلیون تن از تولید شکر جهانی (۲۹ درصد) را به خود اختصاص داده است (۸). میزان تولید شکر چغندرقند در داخل کشور حدود ششصد هزار تن در سال زراعی قبل بوده است (۳).

مهم‌ترین بیماری که زراعت چغندرقند را تهدید می‌کند ریزومانیا[1] است زراعت این گیاه را مختل نموده است. این بیماری می‌تواند حتی تا صد در صد محصول را از بین ببرد. بیماری ریزومانیا اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۵ از سوی ایزدپناه و همکاران از فارس گزارش شد (۹). متعاقب آن بیماری از اکثر مناطق چغندرکاری کشور گزارش شد (۲۳). ویروس عامل ریزومانیا یا BNYVV[2] (۲۲) از طریق شبه‌قارچی به نام پلی‌میکسابتا[3] منتقل می‌شود (۱۰). تنها راه حفاظت محصول چغندرقند در مزرعه‌ی آلوده به BNYVV، کشت ارقام مقاوم است. عمدتاً دو ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند شناسایی شده‌اند که از منابع مختلف منشأ گرفته‌اند و به‌صورت Rz_1 و Rz_2 نام‌گذاری شده‌اند (۲۰).

با توجه به این 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 این‌رو با استفاده از روش‌های مولکولی (روش تکمیلی و یا جایگزین) می‌توان گیاهان دارای 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 (۱۳).

لین و همکاران (۱۱) با استفاده از چهار آنالوگ ژن مقاومت از چغندرقند به نام‌های (cZR-1، cZR-9، cZR-7 و cZR-3) دریافتند که این آنالوگ‌ها روی کروموزوم شماره ۳ قرار داشته و همراه با جایگاه ژن کمی بزرگ اثر مقاومت به ریزومانیا تفکیک می‌شوند. امیری و همکاران (۲) با استفاده از تکنیک RAPD در

1- Rhizomania 2- Beet Necrotic Yellow Vein Virus 3 -Polymyxabetaekeskin

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]

جمعیت F_2 حاصل از تلاقی رگه‌های نر عقیم ۲۶۱ و چغندر یک ساله با منابع مقاومت Holly و WB42 موفق شدند یک نشان‌گر ناجفت با پیوستگی شدید (با فاصله ۳/۶ سانتی‌مورگان) برای مکان ژنی *Rz2* حاصل از منبع WB42 و یک نشان‌گر جفت با پیوستگی کم برای مکان ژنی *Rz1* حاصل از منبع Holly به‌دست آورند. نوروزی و فقهی (۱۴) با استفاده از تکنیک RAPD موفق به شناسائی نشان‌گرهای R1 و R2 به‌ترتیب در فواصل ۲/۳۲ و ۸/۳ سانتی‌مورگان از ژن *Rz1* در فاز ناجفت و نشان‌گرهای C4 وC1 به‌ترتیب در فواصل ۲۱/۴ و ۲۷/۵ سانتی‌مورگان از ژن *Rz1* در فاز جفت شدند. نوروزی و همکاران (۱۵) از یک نشان‌گر ناجفت برای بررسی اثر دز ژن مقاومت به ریزومانیا استفاده نمودند و نتیجه گرفتند که ژنوتیپ‌های هموزیگوت غالب نسبت به هتروزیگوت‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند.

هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین نشان‌گر مولکولی ناجفت مذکور با نتایج الایزا و میزان مقاومت به ریزومانیا در شرایط مزرعه‌ای در چغندرقند با هدف استفاده از غربال مولکولی برای ارزیابی مقاومت به ریزومانیا در رگه‌ها و توده‌ای اصلاحی چغندرقند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ژنوتیپ‌های چغندرقند شامل۱۶ فامیل اصلاحی S_1 از منشاء مقاومت به ریزومانیا Holly دارای ژن *Rz1* به همراه یک رقم تجارتی حساس (جلگه) و مقاوم (طوس) بودندکه در ایستگاه تحقیقاتی زرقان فارس، در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار تک خطی به منظور بررسی مقاومت به ریزومانیا در اوایل اردیبهشت کشت شده بودند. در اواسط مرداد میزان رشد بوته‌ها برای هر ژنوتیپ بر اساس وضعیت ظاهری اندام‌هوایی از یک (کمترین رشد) تا پنج (بیشترین رشد) امتیازدهی شد. در زمان برداشت آزمایش در آبان ماه، شدت آلودگی ریشه به بیماری ریزومانیا بر اساس وضعیت ظاهری علائم روی ریشه، میزان ریشه ریشی و رنگ دستجات آوندی طبق روش وایزلر و همکاران (۲۴) و لوترباخر و همکاران (۱۲) در مقیاس ۱ تا ۹ نمره دهی انجام شد. در این مقیاس نمره ۱ به گیاهان با ریشه‌های سالم (فاقد ریشه ریشی و بدون تغییر رنگ آوندی) و نمره ۹ به ریشه‌های با ریشه ریشی فراوان و نکروز آوندی و پوسیده داده شد. ریشه‌ای با نمرات آلودگی ۳-۱ به‌عنوان مقاوم، ۵-۳ به‌عنوان نسبتاً مقاوم، ۷-۵ نسبتاً حساس و ۹-۷ به‌عنوان کاملاً حساس در نظر گرفته شدند. به هر کرت (یک خط سه متری) یک شدت آلودگی منتسب شد و سپس سه ریشه به‌طور تصادفی از هر کرت انتخاب و نمره آلودگی به تک ریشه‌ها نیز داده شد و از آن‌ها نمونه برگ و ریشه تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. فهرست ژنوتیپ‌های منتخب نمونه‌برداری شده برای ارزیابی‌های مولکولی و الایزا به شرح جدول ۱ می‌باشد.

آزمون الایزا (ELISA)

اندازه‌گیری غلظت ویروس در ریشه‌چه گیاهان با استفاده از آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) مطابق روش معمول انجام شد (۶،۱). سپس میانگین جذب نمونه‌های سالم در هر پلیت الایزا ($\overline{X}$) و انحراف معیار (Sd) مقادیر جذب الایزای نمونه‌های سالم از میانگین آنها محاسبه شد. با محاسبه $2\overline{X}$ و $\overline{X}$ + 3Sd دو آستانه برای ارزیابی مقاومت نمونه‌ها به‌دست آمد. نمونه‌های با OD (مقدار جذب الایزا) بالای $2\overline{X}$ آلوده و حساس و با OD پایین‌تر از $\overline{X}$ + 3Sd مقاوم و غیرآلوده و بین این دو آستانه، نمونه‌ها آلوده و حد واسط در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA با روش تغییریافته دلاپورتا و همکاران (۷) انجام شد.

آزمون مولکولی RAPD – PCR

واکنش زنجیره‌ای 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 10xbuffer، ۲ میکرولیتر dNTP ۲/۵ میلی‌مولار، ۱/۸ میکرولیتر MgCl2 با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۳۰ ng/µl ، ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی‌مراز بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر با مراحل زیر شامل: ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد، توسعه آغازگر به مدت ۸۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش صورت گرفت. سپس الکتروفورز محصولات واکنش RAPD در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰، رنگ‌آمیزی ژل در اتیدیوم‌بروماید و عکس‌برداری در دستگاه مستندساز ژل انجام گرفت. در نهایت، الگوی نواربندی ژنوتیپ‌ها روی ژل مشخص شد.

محاسبات آماری

تجزیه واریانس داده‌های مقادیر جذب الایزا و نمرات آلودگی ریشه در مزرعه برای ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc.,

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]

Cary, NC) و مقایسه میانگین داده‌ها با روش آزمون دانکن صورت گرفت. برای تعیین درصد توافق بین نتایج نشان‌گر مولکولی با نتایج الایزا و مقاومت مزرعه‌ای و نیز توافق الایزا با مقاومت مزرعه‌ای در هر ژنوتیپ از حاصل تقسیم تعداد گیاهان دارای توافق به کل نمونه‌های آزمون شده استفاده شد. برای ارتباط بین نمره رشد اندام هوایی در میان فصل با نمره آلودگی ریشه در پایان فصل از هم‌بستگی ساده پیرسون استفاده شد. هم‌چنین تجزیه خوشه‌ای برای دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس دو صفت میانگین داده‌های الایزا و نمره آلودگی ریشه در مزرعه انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش مزرعه‌ای

وضعیت آلودگی در مزرعه بسیار مشهود بود زیرا شاهد حساس تحت تأثیر کامل بیماری قرار گرفته بود و شدت آلودگی آن ۶/۲۹ برآورد شد و شدت آلودگی شاهد مقاوم ۲/۷۵ بود (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها برای صفات شدت آلودگی ریشه در مزرعه و مقادیر جذب الایزا با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن

فنوتیپ	میانگین شدت آلودگی ریشه در مزرعه	میانگین مقادیر جذب الایزا	ژنوتیپ
نسبتاً مقاوم	$۴/۲۵^{cde}$	$۰/۱۲۶^{bcd}$	S_1-۸۸۰۲۷
نسبتاً مقاوم	$۳/۱۶^{erg}$	$۰/۰۸۰^{a}$	S_1-۸۸۰۳۲
نسبتاً حساس	$۶/۰۰^{b}$	$۰/۲۰۵^{abcd}$	S_1-۸۸۰۳۴
مقاوم	$۲/۴۷^{g}$	$۰/۱۳۰^{bcd}$	S_1-۸۸۱۱۹
نسبتاً مقاوم	$۴/۷۵^{c}$	$۰/۱۷۶^{bcd}$	S_1-۸۸۱۲۰
نسبتاً مقاوم	$۳/۵۴^{derg}$	$۰/۱۲۳^{bcd}$	S_1-۸۸۱۲۵
نسبتاً مقاوم	$۳/۴۵^{derg}$	$۰/۳۷۹^{ab}$	S_1-۸۸۱۲۷
نسبتاً مقاوم	$۳/۲۹^{erg}$	$۰/۱۱۴^{cd}$	S_1-۸۸۱۳۶
نسبتاً مقاوم	$۴/۴۱^{cd}$	$۰/۳۷۸^{ab}$	S_1-۸۸۱۶۱
نسبتاً مقاوم	$۴/۱۶^{cder}$	$۰/۲۴۶^{abcd}$	S_1-۸۸۱۶۲
نسبتاً حساس	$۶/۵۴^{b}$	$۰/۴۴۱^{a}$	S_1-۸۸۱۷۳
نسبتاً مقاوم	$۴/۵۰^{cd}$	$۰/۱۷۹^{bcd}$	S_1-۸۸۱۷۸
نسبتاً مقاوم	$۴/۷۵^{c}$	$۰/۲۱۷^{abcd}$	S_1-۸۸۱۹۶
نسبتاً مقاوم	$۳/۱۳^{rg}$	$۰/۱۳۹^{bcd}$	S_1-۸۸۲۲۹
مقاوم	$۲/۵۰^{g}$	$۰/۱۱۹^{bcd}$	S_1-۸۸۲۳۹
کاملاً حساس	$۷/۶۶^{a}$	$۰/۳۵۸^{abc}$	S_1-۸۸۲۶۴
مقاوم	$۲/۷۵^{g}$	$۰/۱۴۹^{bcd}$	شاهد مقاوم (طوس)
کاملاً حساس	۶/۲۹	۰/۳۷۹	شاهد حساس (جلگه)**

*: اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

**: شاهد حساس فقط جهت صحت شرایط آلودگی آزمایش بوده و در مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها در نظر گرفته نشده است.

بنابراین به‌نظر می‌رسد با توجه به خاک‌زاد بودن عامل بیماری، آلودگی مزرعه از یک‌نواختی نسبی برخوردار بوده و غربال ژنوتیپ‌ها در شرایط آلوده صورت گرفت و نتایج آزمایش قابل اطمینان است. ژنوتیپ‌های آزمایشی بر اساس شدت آلودگی ریشه در مزرعه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن گروه‌بندی شدند (جدول ۱). به استناد نتایج مزرعه‌ای، لاین‌های ۸۸۱۱۹ و ۸۸۲۳۹ به همراه شاهد مقاوم در یک گروه قرار گرفته و شدت آلودگی کمتر از ۳ (در مقیاس ۹-۱) داشتند. ژنوتیپ S1-88264 هم بالاترین شدت آلودگی را به‌خود اختصاص داد. این نتایج با نتایج وضعیت ظاهری آنها در اواسط دوره رشد (جدول ۲) هم‌خوانی داشت. به‌طوری‌که هم‌بستگی منفی معنی‌داری (حدود ۸۰ درصد) بین نمره رشد میان فصل اندام هوایی چغندرقند در مزرعه آلوده با شدت آلودگی ریشه در اواخر فصل وجود داشت که نشان می‌دهد از این معیار نیز می‌توان برای غربال اولیه لاین‌ها بدون نگه‌داری آن‌ها تا اخر فصل در مزرعه استفاده نمود. البته با توجه به جدول یک در برخی ژنوتیپ‌ها مانند S1-88034 علی‌رغم نمره رشد زیاد ولی مقاومت کمی داشته است و در نتیجه، همیشه نمی‌توان گفت رشد بهتر و سبز بودن گیاهان چغندر در مزرعه آلوده نشانه مقاومت آنها به ریزومانیا است ولی عکس این مسئله صادق است، یعنی گیاهان کم رشد و زرد رنگ به احتمال زیاد دارای ریشه کوچک و آلوده به ریزومانیا می‌باشند. سلطانی و همکاران (۲۱) رابطه منفی قوی بین شدت آلودگی به ریزومانیا همراه با زردی برگ‌ها در اواسط دوره رشد و عملکرد ریشه را گزارش نمودند. تعداد زیادی از لاین‌ها شدت آلودگی بین ۵-۳ داشتند. می‌توان چنین استنتاج نمود که این لاین‌ها (اولین نسل فامیل تمام خواهری از توده‌های مورد نظر) با توجه به فراوانی ژن Rz_1 در آن‌ها آلودگی‌های متوسط داشتند. وجود ژنوتیپ‌های *RzRz*، *Rzrz* و *rzrz* در آن‌ها باعث شده است چنین فنوتیپی را بروز دهند (۲۴).

بررسی آزمون الایزا

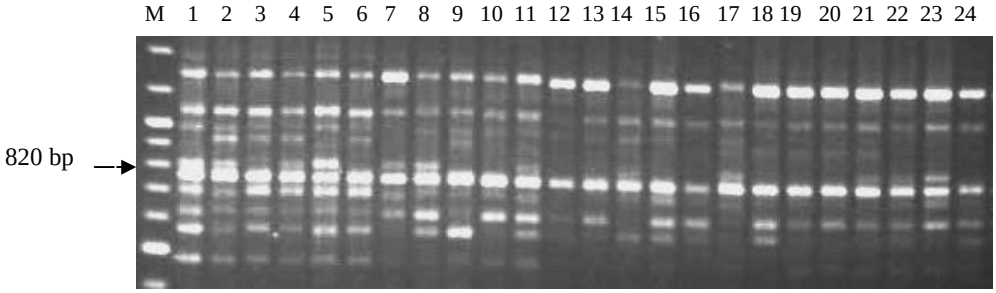
وضعیت مقاومت ژنوتیپ‌ها بر اساس مقادیر جذب الایزا و دو حد آستانه در جدول یک آمده است. ژنوتیپ‌های آزمایشی بر اساس مقادیر جذب الایزا با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن گروه‌بندی شدند (جدول ۱). بر این اساس، ژنوتیپ S1-88032 با میزان جذب ۰/۰۸ کمترین میزان آلودگی در آزمون الایزا را نشان داد که نشان‌گر غلظت کم ویروس در این ژنوتیپ می‌باشد. ژنوتیپ‌های S1-88119، S1-88239، S_1-88229، S_1-88032 و S_1-88136 نیز به‌ترتیب با ۲/۴۷، ۲/۵، ۳/۱۲۵، ۳/۱۶ و ۳/۲۹ کمترین میانگین شدت آلودگی در مزرعه را نشان دادند.

جدول ۲- رابطه بین نمره رشد اندام هوائی در میان فصل با شدت آلودگی ریشه در آخر فصل

ردیف	شماره ژنوتیپ	نمره رشد در مرداد ماه	شدت آلودگی ریشه در آبان ماه
۱	S_1-۸۸۰۲۷	۵/۰۰	۴/۲۵
۲	S_1-۸۸۰۳۲	۴/۲۵	۳/۱۶
۳	S_1-۸۸۰۳۴	۴/۲۵	۶/۰۰
۴	S_1-۸۸۱۱۹	۵/۰۰	۲/۴۷
۵	S_1-۸۸۱۲۰	۴/۵۰	۴/۷۵
۶	S_1-۸۸۱۲۵	۴/۵۰	۳/۵۴
۷	S_1-۸۸۱۲۷	۴/۶۷	۳/۴۵
۸	S_1-۸۸۱۳۶	۴/۵۰	۳/۲۹
۹	S_1-۸۸۱۶۱	۴/۶۷	۴/۴۱
۱۰	S_1-۸۸۱۶۲	۴/۳۳	۴/۱۶
۱۱	S_1-۸۸۱۷۳	۲/۶۷	۶/۵۴
۱۲	S_1-۸۸۱۷۸	۳/۲۵	۴/۵۰
۱۳	S_1-۸۸۱۹۶	۳/۲۵	۴/۷۵
۱۴	S_1-۸۸۲۲۹	۴/۶۷	۳/۱۳
۱۵	S_1-۸۸۲۳۹	۴/۳۳	۲/۵۰
۱۶	S_1-۸۸۲۶۴	۱/۶۷	۷/۶۶
۱۷	شاهد حساس (جلگه)	۲/۰۰	۶/۲۹
۱۸	شاهد مقاوم (طوس)	۴/۶۷	۲/۷۵
همبستگی ساده پیرسون		-۰/۸۱	

بررسی حضور نشان‌گر مولکولی ناجفت در ژنوتیپ‌ها

آزمون مولکولی RAPD با نشان‌گر ناجفت (شکل ۱) در تک بوته‌های هر یک از ژنوتیپ‌های منتخب برداشت شده از مزرعه آلوده بر طبق جدول یک نشان داد که این نشان‌گر در اکثر ژنوتیپ‌ها دارای چندشکلی مورد انتظار بوده و درصد حضور و توافق آن با نتایج الایزای مربوط به ریشه گیاهان مزرعه‌ای (جدول ۳) و با نتایج نمره مقاومت مزرعه‌ای (جدول ۳) در توده‌های مختلف متغیر می‌باشد. هم‌چنین درصد توافق بین نتایج الایزا با نتایج مقاومت مزرعه‌ای نیز در جدول ۳ محاسبه شده است. نوحی و همکاران (۱۶) با استفاده از داده‌های یک نشان‌گر ناجفت و مقادیر جذب الایزا در یک توده F2 توانستند ژنوتیپ‌های هموزیگوت غالب را از هتروزیگوت تفکیک نمایند و میانگین جذب الایزای مشابه‌ای برای این دو ژنوتیپ به‌دست آوردند. ایشان نتیجه گرفتند که دز ژن Rz_1 تأثیری در میزان مقاومت به ریزومانیا ندارد. 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 نتیجه‌گیری ایشان ناشی از این مسئله بوده باشد.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشان‌گر ناجفت در ۲۴ تک بوته از یکی از ژنوتیپ‌ها.
M: نشان‌گر تعیین اندازه DNA (Lambda DNA /*Eco*RI+*Hind*III Marker).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]

نتایج تحقیقات گذشته وجود یک ژن بزرگ اثر برای ایجاد مقاومت به ریزومانیا را تأیید کرده است (۱،۴،۵،۱۶،۱۷،۱۸). امیری و همکاران (۲) با استفاده از نشان‌گر RAPD اقدام به شناسایی نشان‌گرهای مولکولی پیوسته با ژن(های) مقاومت به ریزومانیا نمودند. آن‌ها برای منبع مقاومت Holly یک نشان‌گر جفت با پیوستگی کم و برای منبع مقاومت WB42 یک نشان‌گر ناجفت با پیوستگی شدید شناسایی کردند که فاصله آن از مکان ژنی *Rz2* در منبع مقاومت WB42 حدود ۳/۶ سانتی‌مورگان به‌دست آمد. نشان‌گری که در تحقیق حاضر برای آزمون ژنوتیپ‌ها به‌کار رفت از نوع ناجفت بود و آلل ژن حساس به ریزومانیا را شناسائی می‌کرد. به‌طوری‌که حضور باند نشان‌گر نشانه حساس و یا هتروزیگوت بودن بوته و عدم حضور باند مربوط به نشان‌گر نشان‌دهنده وضعیت هموزیگوت غالب مقاوم در آن بوته بوده است. نوروزی و همکاران (۱۵) در تحقیقات خود نشان دادند که دو نشان‌گر مولکولی که با ژن *Rz1* پیوستگی دارند در بیش از ۸۰ درصد بوته‌های ارقام تجارتی مقاوم دیده می‌شوند.

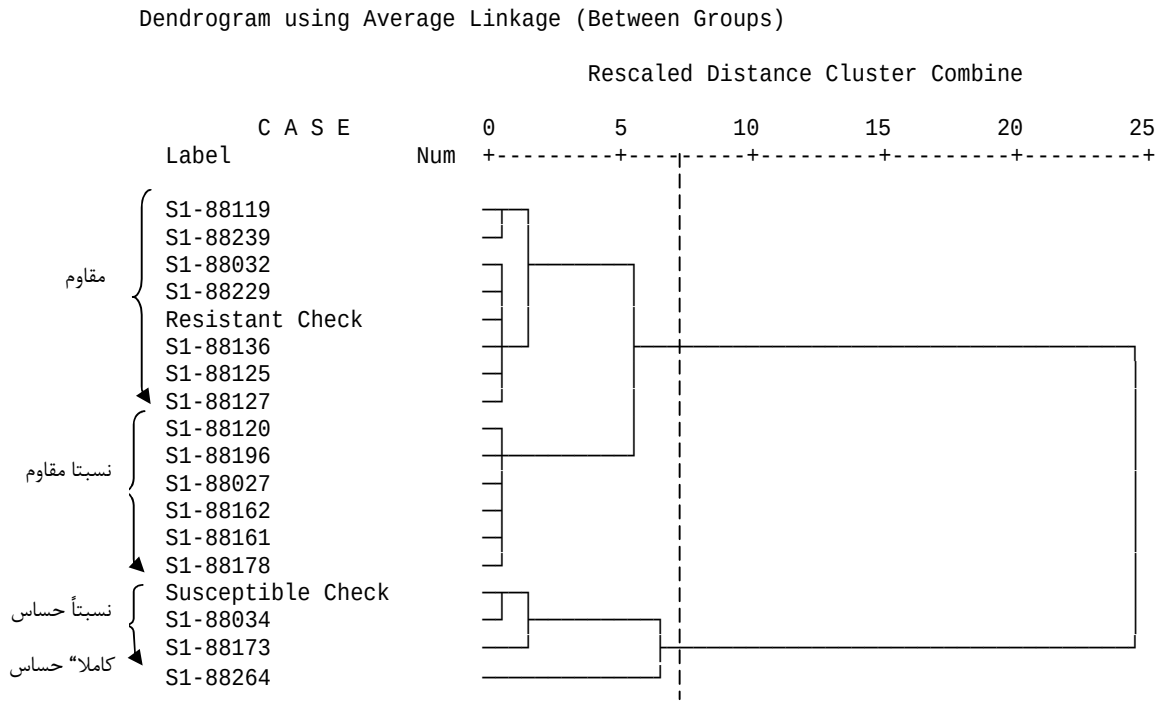
جدول ۳- میانگین شدت آلودگی به ریزومانیا و درصد توافق آن با نتایج حاصل از الایزا و نشان‌گر مولکولی ناجفت

ردیف	درصد توافق الایزا با مقاومت مزرعه‌ای	درصد توافق نشان‌گر با مقاومت مزرعه‌ای	درصد توافق نشان‌گر با الایزا	درصد مقاومت بر اساس الایزا**	میانگین شدت آلودگی به ریزومانیا*	ژنوتیپ
۱	۸۰	۷۹	۸۴	۱۷	۶/۲۹	شاهد حساس (جلگه)
۲	۶۳	۹۴	۶۲	۶۶	۲/۷۵	شاهد مقاوم (طوس)
۳	۶۷	۷۸	۸۹	۷۸	۴/۲۵	S_1-۸۸۰۲۷
۴	۹۲	۹۲	۱۰۰	۱۰۰	۳/۱۶	S_1-۸۸۰۳۲
۵	۵۵	۵۰	۷۳	۴۵	۶/۰۰	S_1-۸۸۰۳۴
۶	۸۲	۱۰۰	۸۸	۸۳	۲/۴۷	S_1-۸۸۱۱۹
۷	۵۰	۸۳	۹۲	۸۳	۴/۷۵	S_1-۸۸۱۲۰
۸	۹۰	۸۲	۹۱	۷۳	۳/۵۴	S_1-۸۸۱۲۵
۹	۸۹	۱۰۰	۸۹	۷۸	۳/۴۵	S_1-۸۸۱۲۷
۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۲	۳/۲۹	S_1-۸۸۱۳۶
۱۱	۸۳	۹۲	۹۲	۴۲	۴/۴۱	S_1-۸۸۱۶۱
۱۲	۸۹	۸۳	۸۳	۴۲	۴/۱۶	S_1-۸۸۱۶۲
۱۳	۱۰۰	۷۳	۷۰	۱۰	۶/۵۴	S_1-۸۸۱۷۳
۱۴	۷۸	۹۱	۹۱	۶۶	۴/۵۰	S_1-۸۸۱۷۸
۱۵	۷۱	۷۳	۷۳	۳۶	۴/۷۵	S_1-۸۸۱۹۶
۱۶	۸۰	۱۰۰	۹۲	۸۳	۳/۱۲	S_1-۸۸۲۲۹
۱۷	۸۶	۱۰۰	۸۶	۸۶	۲/۵۰	S_1-۸۸۲۳۹
۱۸	۷۹	۸۳	۸۳	۱۴	۷/۶۶	S_1-۸۸۲۶۴
	۸۰	۸۶	۸۵		میانگین کل ژنوتیپ‌ها	

*: از میانگین وزنی نمرات آلودگی تک بوته‌های مربوط به هر ژنوتیپ، شدت آلودگی برای هر ژنوتیپ به‌دست آمده است.
**: درصد بوته‌هایی که مقدار جذب الایزای آنها کمتر از دو برابر میانگین جذب نمونه‌های سالم است به‌عنوان درصد بوته‌های مقاوم بر اساس الایزا در نظر گرفته شده‌اند.

در بین ۱۶ ژنوتیپ S1 از نظر درصد توافق مقادیر جذب الایزا با نتایج نشان‌گر مولکولی، ژنوتیپ S1-88032 با ۱۰۰ درصد بیشترین توافق و ژنوتیپ‌های S1-88196 و S1-88034 با ۷۳ درصد کمترین توافق را دارند. در بین ۱۶ ژنوتیپ S1 از نظر درصد توافق شدت آلودگی ریشه در مزرعه (مقاومت مزرعه‌ای) با نتایج نشان‌گر مولکولی، ژنوتیپ‌های S1-88119، S1-88127، S1-88136، S1-88229، S1-88239، S1-88032 بیشترین توافق و ژنوتیپ S1-88034 کمترین توافق را دارند. در بین ۱۶ ژنوتیپ S1 از نظر درصد توافق بین مقادیر جذب الایزا و شدت آلودگی ریشه در مزرعه (مقاومت مزرعه‌ای)، ژنوتیپ‌های S1-88173 و S1-88136 با ۱۰۰ درصد بیشترین توافق و ژنوتیپ S1-88120 با ۵۰ درصد کمترین توافق را دارند. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد که هم‌بستگی مثبت و بالایی بین نتایج نشان‌گر ناجفت مذکور با مقاومت و حساسیت بوته‌ها در مزرعه آلوده و داده‌های حاصل از الایزا می‌تواند وجود داشته باشد. هم‌چنین نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس دو صفت مقاومت مزرعه‌ای و داده‌های الایزا نشان داد که ژنوتیپ‌ها در چهارگروه مقاوم، نسبتاً مقاوم، نسبتاً حساس و کاملاً حساس گروه‌بندی می‌شوند (نمودار ۱). ژنوتیپ‌های S_1-88119، S_1-88032، S_1-88229، S_1-88136، S_1-88125 و S_1- 88127 در گروه مقاوم قرار گرفتند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]



نمودار ۱- دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس دو صفت مقاومت مزرعه ای و داده‌های الایزا با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای.

استفاده از ارقام مقاوم در کنترل هر بیماری یکی از ساده‌ترین و در عین حال مطمئن‌ترین روش مبارزه است. برای شناسایی گیاهان مقاوم به ریزومانیا در چغندرقند روش‌های فنوتیپی در مزرعه و روش‌های سرولوژیکی مانند الایزا و نیز روش‌های ژنوتیپی با استفاده از نشان‌گرهای مولکولی وجود دارد. با توجه به این 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 برخی از گیاهان از عامل آلوده‌کننده به نحوی می‌گریزند و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این‌رو با استفاده از روش‌های مولکولی، که روش تکمیلی و یا جایگزین محسوب می‌شوند، می‌توان گیاهان دربردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. در این تحقیق نشان‌گر ناجفت به‌دست آمده (۱۵)، روی تعدادی از توده‌های اصلاحی و ارقام تجارتی مقاوم و حساس به ریزومانیا از منشاء Holly که در مزرعه آلوده به ریزومانیا کشت شده بودند مورد ارزیابی قرار گرفت. ارتباط بین نتایج نشان‌گر، نتایج الایزا و نمره آلودگی ریشه در مزرعه به صورت دو به دو بررسی شد. نتایج نشان داد که در میان ژنوتیپ‌ها میزان توافق نشان‌گر با الایزا بین ۶۲ تا ۱۰۰ درصد، نشان‌گر با مقاومت مزرعه‌ای بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد و الایزا با مقاومت مزرعه‌ای نیز بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر بوده است. در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی، میانگین توافق نشان‌گر با الایزا ۸۵ درصد، نشان‌گر با مقاومت مزرعه‌ای ۸۶ درصد و الایزا با مقاومت مزرعه‌ای ۸۰ درصد به‌دست آمد و داده‌های مولکولی، الایزا و مزرعه یکدیگر را تأیید نمودند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت محترم مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند که امکانات اجرای این پژوهش را فراهم نموده‌اند کمال قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]

منابع

1. Amiri, R., M. Moghaddam, M. Mesbah, S.Y. Sadeghian, M.R. Ghannadha and K. Izadpanah. 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 (In Persian).
2. Amiri, R., M. Mesbah, M.R. Moghaddam, S.A. Bihamta, A. Mohammadi and P. Norouzi. 2009. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris*. Biologia Plantarum, 53: 112-119 (In Persian).
3. Anonymous. 2013. Utilization Statistics of sugar factories of Iran. http://www.sbsi.ir/sugar_facts (In Persian).
4. Barzen, E., W. Mechelke, E. Ritter, J.F. Seitzer and F. Salamini .1992. RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogermy and hypocotyl colour. Plant Journal, 2: 601-611.
5. Barzen, E., R. Stahl, E. Fuchs, D.C. Borchardt and F. Salamini .1997. Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet Rr1 allele conferring resistance to rhizomania. Molecular Breeding, 3: 231-238.
6. Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.
7. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks .1983. A plant DNA minipreparation version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.
8. Draycott, A.P. 2006. Sugar Beet (World Agriculture Series). Wiley-Blackwell. London. 496 pp.
9. Izadpanah, K., P. Hashemi, R. Kamran, M. Pakniat, A. Sahanpour and M. Masoomi. 1996. Occurance of beard-root disease (like rhizomania) in Fars province. Plant Pathology Journal, 23: 200-206 (In Persian).
10. Keskin, B. 1964. *Polymyxa betae* n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Archives of Microbiology, 49: 348-374.
11. Lein, J.C., K. Asbach, Y. Tian, D. Schulte, C. Li, G. Koch, C. Jung and D. Cai. 2007. Resistance gene analogues are clustered on chromosome 3 of sugar beet and cosegregate with QTL for rhizomania resistance. Genome, 50: 61-71.
12. Luterbacher, M.C., M.J.C. Asher, W. Beyer, G. Mandolino, O.E. Scholten, L. Frese, E. Biancardi, P. Stevanato, W. Mechelke and O. Slyvchenko. 2005. Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm: II. Soil-borne diseases. Euphytica, 141: 49-63.
13. Norouzi, P. 2007. Screening of plants resistant to beet cyst nematode using molecular marker. Proceeding of second national molecular and cellular biology congress of Iran. International Science and High Technology Center. Kerman, 1: 516-518 (In Persian).
14. Norouzi, P. and S.M.A. Feghhi. 2009. Identification of some RAPD molecular markers linked to rhizomania resistance gene in sugar beet. Proceeding of 6th National Biotechnology Congress of Iran, 112 pp (In Persian).
15. Norouzi, P., D. Rahmani, S. Oroojalian, S.B. Mahmoudi, M. Aghaiezadeh, M. Kakueinezhad, M.R. Orazizadeh, S. Vahedi and M.R. Fathi. 2013. Confirmation of repulsion molecular markers linked to rhizomania resistance gene (*Rz1*) and evaluation of gene dose effect in sugar beet genotypes. Sugar Beet Journal, In press (In Persian).
16. Nouhi, A.A., R. Amiri, A. HaghNazari, 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: 37-41.
17. Scholten, O. E., R.C. Jansen, L.C. Paul Keizer, T.S. M. De Bock and W. Lang. 1996. Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. Euphytica, 91: 331-339.
18. Scholten, O.E., R.M. Klein-Lankhosrst, D.G. Esselink, T.S.M. De Boek and W. Lange. 1997. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta* accessions. Theoretical and Applied Genetics, 94: 123-130.
19. Scholten, O.E., T.S.M. De Bock, R.M. Klein-Lankhorst and W. Lange. 1999. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris*, conferred by a second gene for resistance. Theoretical and Applied Genetics, 99: 740-746.
20. Scholten, O.E. and W. Lange. 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica, 112: 219-231.
21. Soltani idliki, J., M. Ahmadi, H.A. Shahbazi and S.B. Mahmoudi. 2010. Comparison of applied evaluation methods for sugar beet varieties resistant to rhizomania in field trails. Proceeding of 19th Iranian Plant Protection Congress, 31 July-3 August. 698 pp (In Persian).
22. Tamada, T. 1975. Beet Necrotic Yellow Vein Virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses, 144-256 pp.
23. Toodehfallah, M., N. Arjomand and B. Mahmoudi. 2000. 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, 72 pp (In Persian).
24. Wisler, G.C., R.T. Lewellen, J.L. Sears, H.Y. Liu and J.E. Duffus. 1999. Specificity of TAS-ELISA for beet necrotic yellow vein virus and its application for determining rhizomania resistance in field grown sugar beets. Plant Disease, 83: 864-870.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]

Relationship among Repulsion Molecular Marker, Disease Index of *Rhizomania* in Field and Virus Concentration in Sugar Beet Root

Peyman Norouzi[1], Mojdeh Kakuei Nezhad[2], Seyyed Bagher Mahmoudi[3] and Saeed Darabi[4]

1- Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (Corresponding author: norouzi@sbsi.ir)
2 and 3- Instructor and Associate Professor respectively, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4- Instructor of Fars Research Center for Agriculture and Natural Resources
Received: March 11, 2014 Accepted: May 12, 2014

Abstract

The aim of the present study was to determine the relationship between a repulsion molecular marker with resistance to rhizomania in infested field condition and virus concentration in sugar beet root (ELISA absorbance values). For this purpose, the genotypes were planted in infested area of Shiraz in the randomized block design with four replications. At the end of the season, the roots were harvested and root disease scores were assigned for each plot and also for three single roots per plot for 16 selected genotypes. Also, leaf and root samples were taken from the plants and then in laboratory, root samples were extracted and tested by ELISA method and DNA extraction was done on leaf samples for molecular analysis. In next step, primer related to a repulsion marker was tested on single plants DNAs by RAPD-PCR method and scored according to presence and absence of marker band. Then, analysis of variance, genotypes grouping and cluster analysis were done for field resistance and ELISA data. The genotypes were classified into some groups based on ELISA absorbance values and root severity index in the field and also based on cluster analysis were classified into four groups: resistant, semi resistant, semi susceptible and very susceptible. Then, the relationship between the results of the marker, ELISA and severity of root infection in the field were investigated as pairwise comparison. The results showed that agreements between the marker and ELISA, the marker and field resistance and ELISA and field resistance were 85, 86 and 80 percent respectively. In totally, molecular marker, ELISA and field data confirmed each other.

Keywords: RAPD, Repulsion Marker, Resistance, Rhizomania, Sugar Beet

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.17.13.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.130]