

## تکرار پذیری برخی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به *(Beta vulgaris L.)* در ژنوتیپ های چغندر قند (Rz1)

پ. نوروزی<sup>۱</sup>، س. ب. محمودی<sup>۲</sup>، م. آقائی زاده<sup>۳</sup>، م. کاکوئی نژاد<sup>۳</sup>، م. ر. اوراضی زاده<sup>۳</sup>، س. واحدی<sup>۳</sup> و  
م. ر. فتحی<sup>۴</sup>

۱- استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند (نويسنده مسؤول)  
۲، ۳ و ۴- استادیار، مریب پژوهشی و کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند  
تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۱۸

### چکیده

ریزومانیا مهمترین بیماری چغندر قند در ایران و برخی از مناطق جهان است که می تواند نقش مهمی در کاهش عملکرد شکر داشته باشد. بهترین راهکار مقابله با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. ردبایی ژن های مقاومت با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه های به نزدیک ضروری است. در این تحقیق برای تایید و تکرار پذیری نه نشانگر مولکولی جفت، از چندین توده اصلاحی و رقم تجاری چغندر قند که حامل ژن مقاومت Rz1 بودند استفاده شد. برای این منظور از داده های موجود الیزا مربوط به ارزیابی گلخانه ای مقاومت به ریزومانیا در چندین توده اصلاحی استفاده شد. برای آزمون مولکولی، نمونه های برگی از گیاهان مورد نظر جداسازی و پس از استخراج DNA آزمون RAPD و PCR با کمک آغازگرهای مرتبط با نشانگرهای مورد نظر انجام گرفت. محصولات RAPD و PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی، نتایج مربوط به نشانگرها مشاهده و به حضور و عدم حضور نشانگر امتیاز دهی شد. درصد توافق نتایج نشانگرها با داده های الیزای مربوط به تک بوته ها در توده های اصلاحی و نیز درصد حضور نشانگرها در ارقام تجاری محاسبه گردید. مقایسه بین نتایج الیزا و آزمون مولکولی نشان داد که از میان نشانگرها، دو نشانگر جفت (نشانگر پیوسته با آلل مقاومت) موسوم به PN1 و PN2 به ترتیب با نسبت توافق ۷۱ و ۵۷ درصد با نتایج الیزا، خطای نوع اول شش درصد و نسبت حضور بیش از ۸۰ درصد در ارقام تجاری مقاوم از نشانگرهای مناسب برای شناسائی آلل مقاومت Rz1 بودند.

واژه های کلیدی: چغندر قند، مقاومت، ریزومانیا، نشانگر مولکولی، PCR و RAPD

## اهمیت نشانگرهای DNA در بررسی منابع

**مقاومت به بیماری:** با توجه به آنکه روش های 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 می گیرند و نیز بعضی گیاهان از عامل آلوده کننده به نحوی می گردند و به ظاهر مقاوم تلقی می شوند، از این رو با استفاده از روش های مولکولی، به عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می توان گیاهان دربردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. بنابراین نشانگرهای مولکولی DNA می توانند ابزاری مفید برای انتخاب ژنوتیپ های مقاوم باشند و باعث صرفه جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب گرددند (۱۴).

**نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن های مقاومت به ریزومنیا:** پلسی و مردینوگلو (۱۷) از روش <sup>3</sup>BSA برای شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته با ژن مقاومت به ریزومنیا در منبع Holly استفاده نمودند. از ۱۶۰ آغازگر استفاده شد که ۱۹ آغازگر ۴۴ نشانگر چندشکل تولید نمودند که در ۹ گروه پیوستگی طبقه بندی شدند. شولتن و همکاران (۱۸ و ۱۹)، نام *Rz<sub>1</sub>* را برای ژن WB42 Holly و نام *Rz<sub>2</sub>* را برای ژن (های) WB42 پیشنهاد نمودند. امیری (۱) گزارش نمود که مقاومت در منبع WB42 با یک ژن غالب *Rz2* (Rz1) کنترل می شود و فاصله آن از ژن *Rz1* حدود ۳۵ سانتی مورگان در منبع Holly

1- Rhizomania

4- Bulked Segregant Analysis

2- Beet Necrotic Yellow Vein Virus

3- *Polymyxa beta* Keskin

## مقدمه

**اهمیت چغندرقند:** چغندرقند یکی از دو محصول مهم تأمین کننده قند در جهان می باشد. سطح کشت جهانی آن بالغ بر ۹ میلیون هکتار است. در حال حاضر بیش از ۳۴ میلیون تن (۲۹ درصد) قند استحصال شده به چغندر اختصاص دارد 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 می شود (۷). میزان تولید ریشه چغندرقند در داخل کشور حدود چهار میلیون تن در سال قبل بوده است (۳).

**بیماری ریزومنیا:** مهمترین بیماری که گیاه چغندرقند را تهدید می کند ریزومنیا<sup>۱</sup> می باشد که از مخرب ترین بیماری های چغندرقند است و می تواند حتی تا صد درصد محصول این گیاه را از بین ببرد. این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۵ توسط ایزدپناه و همکاران از فارس گزارش شد (۱۰). متعاقب آن بیماری از اکثر مناطق چغندرکاری کشور گزارش گردید (۲۲). ویروس عامل بیماری ریزومنیا یا BNYVV<sup>۲</sup> (۲۱) توسط قارچی بنام پلی میکسا بتا<sup>۳</sup> منتقل می شود (۱۱). تنها راه حفاظت محصول چغندرقند در مزرعه آلوده به ریزومنیا، کشت ارقام مقاوم است. عمدتاً دو ژن مقاومت به ریزومنیا در چغندر قند شناسایی شده اند که از منابع مختلف منشأ گرفته و بصورت *Rz<sub>1</sub>* و *Rz<sub>2</sub>* نامگذاری شده اند (۲۰).

ترتیب در فواصل ۲۱/۴ و ۲۷/۵ سانتی مورگان از ژن *Rz1* در فاز جفت شدند.

هدف از این تحقیق بررسی تکرار پذیری و تائید نشانگرهای منتخب جفت پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیای چغnderقند از منبع زراعی Holly از طریق مقایسه نتایج نشانگرها با نتایج آزمون الایزا و تعیین درصد حضور نشانگرها در ارقام تجاری مقاوم و حساس چغnderقند برای ارزیابی سریع ژرم پلاسم بود.

### مواد و روشها

**مواد گیاهی:** ژنتیپ‌های گوناگون چغnderقند شامل توده های اصلاحی *S1-A*, *S1-B* و *FC*, والد گرده افshan ۲۰۳۲۲، ارقام تجاری حساس رجينا، شیرین و رسول و ارقام مقاوم فلورس، دوروتی، بیریجیتا و لاتیتیا و ارقام متحمل زرقان و جام جهت تائید نه نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا به کار رفتند. در اغلب ژنتیپ‌ها بین ۱۵۰-۲۰۰ بوته بررسی شد.

**آزمون الایزا (ELISA) برای اندازه گیری غلظت ویروس BNYVV:** اندازه گیری غلظت ویروس در ریشه چه گیاهان با استفاده از آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA) مطابق روش معمول کلارک و آدامز (۵)، که در آزمایشگاه گیاهپزشکی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغnderقند کرج بهینه سازی شده بود انجام شد (۲). **استخراج DNA:** استخراج DNA با روش تغییر یافته دلایپورتا و همکاران (۶) انجام شد. **آزمون مولکولی RAPD -PCR:** واکنش زنجیره پلی مراز برای

می باشد. امیری و همکاران (۲) با بررسی وراثت مقاومت به بیماری ریزومانیای چغnderقند دریافتند که ژن های مقاومت در منابع Holly و WB42 غیر آللی و به صورت پیوسته می باشند. امیری (۱) با استفاده از تکنیک RAPD در جمعیت *F2* حاصل از تلاقی رگه های نرعقیم ۲۶۱ و چغnder 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 *Rz1* جفت با پیوستگی کم برای مکان ژنی *cZR-1* حاصل از منبع Holly بدست آورد. لین و همکاران (۱۲) با استفاده از چهار آنالوگ ژن مقاومت از چغnderقند به نام های (۱) *cZR-9*, *cZR-7* و *cZR-3* دریافتند که این آنالوگ ها روی کروموزوم شماره ۳ قرار داشته و همراه با جایگاه ژن کمی بزرگ اثر مقاومت به ریزومانیا تفکیک می شوند. نوحی و همکاران (۱۶) نیز با استفاده از روشی مشابه و با استفاده از نشانگر RAPD، موفق به شناسایی دو نشانگر به نام های OP-X09 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 (۱۳) نیز به دست آمد. نوروزی (۱۴) و نوروزی و فقهی (۱۵) با استفاده از تکنیک RAPD موفق به شناسایی 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

دقیقه ای توسعه نهایی در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش. همچنین واکنش PCR اختصاصی مشابه شرایط یاد شده در بالا با تفاوت در دمای اتصال آغازگر ( $54^{\circ}$  درجه سلسیوس) انجام شد. سپس محصولات واکنش RAPD یا PCR در ژل آگارز  $1/2$  درصد با ولتاژ  $100$  الکتروفورز شدند و رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و عکس برداری در دستگاه مستند ساز ژل انجام گرفت. در انتها الگوی نواربندی ژنوتیپ ها روی ژل مشخص شد.

**محاسبات آماری:** برای محاسبه فواصل نشانگرها با مکان ژنی  $R_{Z1}$  در حالت ناجفت و جفت از روش بارزن و همکاران (۴) بصورت زیر استفاده گردید:

انجام RAPD و PCR در حجم نهایی  $25\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر برای هر واکنش انجام گرفت. حجم مورد نیاز DNA در یک واکنش،  $1/5$  میکرولیتر با غلظت  $50\text{ ng}/\text{ml}$   $2/5$  میکرولیتر باfer  $10x$ ,  $2$  میکرولیتر dNTP با غلظت  $25\text{ میلی مولار}$ ,  $1/8$  میکرولیتر  $\text{MgCl}_2$  با غلظت  $25\text{ میلی مولار}$ ,  $1$  میکرولیتر با غلظت  $1\text{ ng}/\text{ml}$  از هریک از دو آغازگر،  $0.2\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر(یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی مراز بود.

واکنش زنجیره ای پلی مراز برای آزمون RAPD در دستگاه ترموسایکلر با مراحل زیر صورت گرفت:  $5$  دقیقه واسرشت سازی اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$ ,  $40$  چرخه شامل واسرشته سازی به مدت  $40$  ثانیه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$ , اتصال به مدت  $40$  ثانیه در دمای  $34^{\circ}\text{C}$ , توسعه به مدت  $1$  دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  و یک مرحله  $10$

$$\frac{\text{تعداد بوته های مقاوم فاقد باند} + \text{تعداد بوته های حساس دارای باند}}{\text{تعداد کل بوته های مورد آزمایش}} = \text{فاصله نشانگر از مکان ژنی در حالت جفت}$$

بوته های آزمون شده استفاده گردید. برای تعیین درصد توافق نتایج الایزا با داده های مولکولی از رابطه زیر استفاده گردید:

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

برای تعیین خطای نوع اول (بوته های حساس دارای باند نشانگر) از تقسیم تعداد بوته های حساس دارای باند نشانگر جفت به تعداد کل

$\bar{X} + 3Sd$  و  $\bar{X} - 3Sd$  به ترتیب خط کش بالا و پایین برای ارزیابی مقاومت نمونه ها بدست می آید. براساس روش امیری و همکاران (۲) نمونه های با  $OD$  بالای  $\bar{X} + 3Sd$  حساس(S)، با  $OD$  پایین تر از  $\bar{X} - 3Sd$  مقاوم و غیرآلوده (R) در نظر گرفته شدند.

## نتایج و بحث

**نتایج آزمون الایزا:** پس از انجام آزمون الایزا نمونه ای که دارای غلظت بیشتر وبروس در ریشه های خود است (فرد حساس تر) رنگ زرد پررنگ تری در چاهک های پلیت الایزا نشان می دهد و عددی که دستگاه الایزا خوان<sup>۱</sup> آشکار می سازد بالاتر است. با اندازه گیری

**نشانگر PN<sub>1</sub>:** باند مشاهده شده در ژنوتیپ های به کار رفته برای این نشانگر در اندازه ۷۵۰ bp به حالت جفت بود. این نشانگر از یک جفت آغازگر ۱۸ نوکلوتیدی در آزمون PCR اختصاصی (STS) روی اکثر توده های اصلاحی S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> و FC، ارقام تجاری حساس (با نسبت ۸۴) (با نسبت ۱۷ درصد) و مقاوم (با عدم درصد) بدست آمد. درصد حضور و درصد توافق این نشانگر در جدول ۱ و الگوی باند مربوط به نشانگر در شکل ۱ آمده است. درصد حضور نشانگر PN<sub>1</sub> در ارقام فلورس و دوروتی ۱۰۰ درصد بود.

در توده هایی که الیزای آنها مشخص شده بود، درصد توافق بین نتایج بدست آمده از آزمون الیزا و RAPD، محاسبه شد و در سایر توده ها تنها درصد حضور ژن تعیین گردید. برای تایید نشانگرهای منتخب در توده های اصلاحی، درصد توافق نشانگر با الیزا و در ارقام تجاری درصد حضور یا عدم حضور نشانگر از اهمیت خاصی برخوردار است که این مسئله در کلیه نتایج مندرج در جداول مربوط به نشانگرها دیده می شود. نتایج مربوط به هر یک از نشانگرهای بررسی شده در این تحقیق به شرح زیر می باشند:

جدول ۱- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN<sub>1</sub> در ژنوتیپ های مختلف چند رقند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الیزا	درصد حضور نشانگر	ملاحظات
۱	S <sub>1</sub> -A	۱۲۴	...	...	فاده چندشکلی
۲	S <sub>2</sub> -A	۷۳	۴۱	...	...
۳	S <sub>1</sub> -B	۱۵۷	۶۴	...	...
۴	FC	۴۲	...	۴۵	...
۵	گرده افshan	۲۰۳۲۲	...	۵۳	...
۶	رقم فلورس	۱۶	...	۱۰۰	...
۷	رقم دوروتی	۱۵	...	۱۰۰	...
۸	ارقام تجاری مقاوم خارجی*	۱۲۶	...	۸۴	...
۹	ارقام تجاری حساس**	۹۶	...	۱۷	...

\*: ارقام تجاری مقاوم فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیتیا      \*\*: ارقام تجاری حساس رسول، شیرین و رجينا.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر جفت PN<sub>1</sub> در برخی تک بوته های توده S<sub>1</sub>-B

SM: نشانگر تعیین اندازه (Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker) DNA

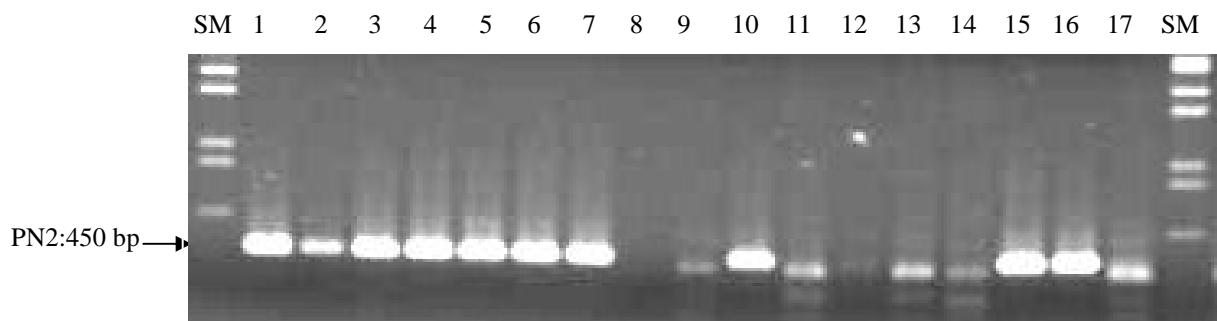
حساس (با نسبت ۱۶ درصد) و مقاوم (با نسبت ۸۳ درصد) بdst آمد. درصد حضور و درصد توافق این نشانگر در جدول ۲ و الگوی باند مربوط به نشانگر در شکل ۲ آمده است. درصد حضور نشانگر PN2 در ارقام فلورس و دوروتی ۱۰۰ درصد بود.

**نشانگر PN2:** باند مشاهده شده در ژنوتیپ های به کار رفته برای این نشانگر در اندازه ۴۵۰ bp به حالت جفت بود. این نشانگر از یک جفت آغازگر ۱۸ و ۲۰ نوکلوتیدی در آزمون PCR اختصاصی (STS) روی اکثر توده های اصلاحی S<sub>1</sub>, FC, ارقام تجاری

جدول ۲- نتایج تکرار پذیری نشانگر جفت PN2 در ژنوتیپ های مختلف چند در قند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر	ملاحظات
۱	S <sub>1</sub> -A	۱۸	...	...	فائد چند شکلی
۲	S <sub>1</sub> -B	۱۴	۷۱	...	...
۳	FC	۴۲	...	۶۰	...
۴	گرده افشار ۲۰۳۲۲	۳۶	...	۵۳	...
۵	رقم فلورس	۱۵	...	۱۰۰	...
۶	رقم دوروتی	۱۴	...	۱۰۰	...
۷	ارقام تجاری مقاوم خارجی*	۸۳	...	۸۳	...
۸	ارقام تجاری حساس**	۴۵	...	۱۶	...

\*: ارقام تجاری مقاوم فلورس، دوروتی، بریجیتا و لانیتیا. \*\*: ارقام تجاری حساس رسول، شیرین و رجینا.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر جفت PN2 در برخی تک بوته های توده S<sub>2</sub>-A (شماره ۱ تا ۴) و برخی تک بوته های توده S<sub>1</sub>-B (شماره ۵ تا ۱۷)، SM: نشانگر تعیین اندازه DNA (Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker).

PN11-1 روی هیبریدهای جدید ۰۰۴، ۰۰۵ و ۰۰۶ موسسه آزمون گردید و نتایج آن به صورت جدول ۳ بdst آمد.

**نشانگر PN11:** باند مشاهده شده برای این نشانگر شامل ۱۳۶۰ bp جفت بود که به صورت PN11-1 نامگذاری شد. نشانگر

جدول ۳- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت ۱ PN11-۱ در برخی هیبریدهای چغندرقند

ردیف	انواع ژنتیپ*	آزمون شده	تعداد بوتهای	درصد توافق نشانگر با الیزا	درصد حضور نشانگر
۱	هیبریدهای جدید موسسه*	۳۳	...	۳۰	.006 و ۰۰۴، ۰۰۵

روی توده های  $S_1$ ، رقم تجاری حساس رسول و مقاوم برجیتا آزمون گردید و نتایج آن به صورت جدول ۴ بدست آمد.

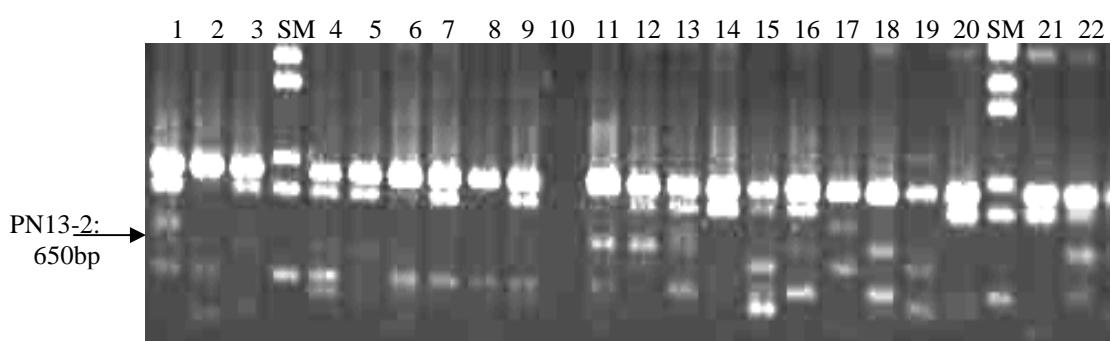
**نشانگر PN12:** باند مشاهده شده در ژنتیپ های به کار رفته برای این نشانگر در اندازه ۶۲۰ bp به حالت جفت بود. این نشانگر

جدول ۴- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت ۱۲ PN12 در ژنتیپ های مختلف چغندرقند

ردیف	انواع ژنتیپ	آزمون شده	تعداد بوتهای	درصد توافق نشانگر با الیزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده های اصلاحی $S_{1-A}$	۱۶	۸۸	...	۴۰
۲	رقم مقاوم برجیتا	۵	...	۴۰	...
۳	رقم حساس رسول	۶	...	۱۷	...

توده های اصلاحی  $S_1$ ،  $S_2$ ،  $S_1$  FC، توده های ارقام تجاری حساس و مقاوم آزمون گردید. درصد حضور و درصد توافق برای آن در جدول ۵ خلاصه شده است.

**نشانگر PN13:** باند مشاهده شده برای این نشانگر شامل ۶۵۰ bp جفت (به نام ۲-۲ PN13-۲) بود. الگوی باندی مربوط به نشانگر در شکل ۳ آمده است. این نشانگر روی هر یک از



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگرهای PN13 روی ۲۲ فرد از توده F2 .(Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker) DNA SM

جدول ۵- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت 2 PN13 در ژنتیک های مختلف چندر قند

ردیف	انواع ژنتیک	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده های اصلاحی S <sub>1</sub> -A	۱۴	۹۳	...
۲	توده های اصلاحی S <sub>2</sub> -A	۳۰	۶۷	...
۳	توده های اصلاحی S <sub>1</sub> -B	۵	.	...
۴	توده های اصلاحی FC	۱۵	...	۴۷
۵	یک توده S1 از گرده افسان ۲۰۳۲۲	۹	...	۸۹
۶	* ارقام تجاری مقاوم خارجی	۴۵	...	۶۹
۷	** ارقام تجاری حساس	۳۸	...	۵۳

\*: ارقام تجاری مقاوم فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیبا.  
\*\*: ارقام تجاری حساس رسول، شیرین و رجينا.

نشانگر مذکور روی ارقام تجاری حساس و مقاوم آزمون گردید. درصد حضور برای آنها در جداول ۶ و ۷ منعکس شده است.

نشانگر PN<sub>14</sub>: باندهای مشاهده شده برای این نشانگر شامل ۹۰۰ bp جفت (به نام ۱-1) (PN14-1) و ۱۰۰۰ bp جفت (به نام ۲-2) (PN14-2) بود. دو

جدول ۶- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت 1 PN14 در ارقام تجاری چندر قند

ردیف	انواع ژنتیک	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	* ارقام تجاری مقاوم خارجی	۳۰	...	۲۳
۲	** ارقام تجاری حساس	۳۵	...	۲۶

\*: ارقام تجاری مقاوم فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیبا.  
\*\*: ارقام تجاری حساس رسول، شیرین و رجينا.

جدول ۷- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت 2 PN14 در ارقام تجاری چندر قند

ردیف	انواع ژنتیک	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	* ارقام تجاری مقاوم خارجی	۳۲	...	۲۸
۲	** ارقام تجاری حساس	۱۴	...	۲۹

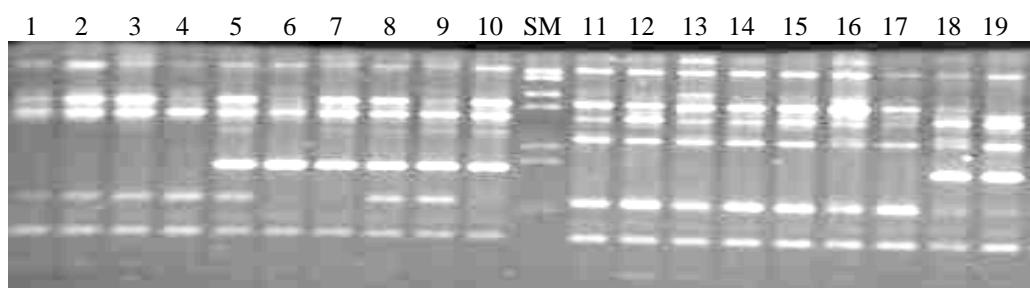
\*: ارقام تجاری مقاوم فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیبا.  
\*\*: ارقام تجاری حساس رسول، شیرین و رجينا.

نشانگر PN<sub>19</sub>: باند مشاهده شده برای این نشانگر در اندازه ۸۲۰ bp به صورت جفت در والد گرده افسان ۲۰۳۲۲ و برخی ارقام تجاری مقاوم دیده شد (شکل ۴). این نشانگر در هیچیک از توده های اصلاحی

نشانگر PN<sub>18</sub>: انداره باند ظاهر شده در این نشانگر ۱۲۵۰ bp به صورت جفت بود. این نشانگر روی نمونه های گیاهی حساس و مقاوم توده S1 آزمایش شدند ولی نتایج آن فاقد هر گونه چند شکلی بود.

نمود. ولی این نشانگر قادر به شناسائی آلل مقاومت در ارقام تجارتی مقاوم بیریجیتا و دوروتی و توده های FC نبود. در ارقام حساس (شیرین، رسول و رجینا) درصد حضور نشانگر جفت همانطور که انتظار می رفت پایین بود.

$S_1$  و  $S_2$  و توده های FC چند شکلی نداشت. نتایج این نشانگر در جدول ۸ آمده است. این نشانگر آلل مقاومت را در توده حاصل از ژنتیپ ۲۰۳۲۲، رقم فلورس و لاتیتیا به خوبی شناسایی و به صورت یک باند قوی و واضح مشخص



شکل ۴- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر جفت PN19، ستون های ۱-۴ رقم بیریجیتا (فاقد باند نشانگر)، ستون های ۵-۱۰ رقم لاتیتیا (دارای باند نشانگر)، ستون های ۱۱-۱۷ رقم رجینا (فاقد باند نشانگر)، ستون های ۱۸-۱۹ رقم فلورس (دارای باند نشانگر)، الگوی الکتروفورزی این نشانگر برای ژنتیپ ۲۰۳۲۲ در این شکل نیامده است. SM: نشانگر تعیین اندازه (Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker) DNA.

جدول ۸- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN19 در ژنتیپ های مختلف چغندر چند

ردیف	آنواع ژنتیپ	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الیزرا	درصد حضور نشانگر	ملاحظات
۱	توده های اصلاحی $S_1$ -A	۱۳	...	...	فاقد چند شکلی
۲	توده های اصلاحی $S_2$ -A	۲۰	...	...	فاقد چند شکلی
۳	توده های اصلاحی $S_1$ -B	۱۶	...	...	فاقد چند شکلی
۴	توده های اصلاحی FC	۶	...	.	فاقد چند شکلی
۵	یک توده $S_1$ از گرده افشار ۲۰۳۲۲	۱۰	۱۰۰	...	...
۶	ارقام تجارتی مقاوم خارجی *	۳۶	۴۲	...	...
۷	ارقام تجارتی حساس **	۲۱	۵	...	یک نشانگر جفت با پیوستگی کم و برای منبع مقاومت WB42 یک نشانگر ناجفت با پیوستگی شدید شناسایی که فاصله آن از مکان ژنی $R_{Z2}$ در منبع مقاومت WB42

\*: ارقام تجارتی مقاوم فلورس، دوروتی، بیریجیتا و لاتیتیا. \*\*: ارقام تجارتی حساس رسول، شیرین و رجینا.

یک نشانگر جفت با پیوستگی کم و برای منبع مقاومت WB42 یک نشانگر ناجفت با پیوستگی شدید شناسایی که فاصله آن از مکان ژنی  $R_{Z2}$  در منبع مقاومت WB42

امیری (۱) 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

توده در حال تفکیک برای ژن هولی استفاده و ثابت نمودند که تنها شش نشانگر از ۱۰ نشانگر مذکور در توده آنها تایید شده و تکرارپذیری دارد. همچنین گریمیر و همکاران (۹) در بررسی تکرارپذیری و تایید 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 مورد بررسی تکرارپذیری داشته و مورد تایید قرار می‌گیرد و سایر نشانگرها با فواصلی که قبلاً گزارش شده بود قابل تایید نبودند. آنها علت این عدم تایید را تکرارپذیری کم برخی از باند های RAPD و نیز تفاوت در زمینه ژنتیکی توده های به کار رفته در تحقیقات افراد مختلف دانستند که این تنوع می‌تواند بر الگوی باندهای RAPD اثر بگذارد.

البته لازم به ذکر است که اولاً تایید نشانگرها مذکور در تحقیق حاضر براساس میانگین چندین توده اصلاحی و یا ارقام تجاری مقاوم و حساس چوندرقدن بدست آمده است و در واقع برای اکثر نشانگرها در همه ژنتیک ها نتایج توافق و یا حضور کاملاً یکسانی بدست نیامده است. بنابراین به نظر می‌رسد در پژوههای آتی اولاً ارتباط نشانگرها مولکولی منتخب در این تحقیق با تعدادی ژنتیک که نمره آلودگی در مزرعه داشته باشند بدست آید تا بهترین نشانگرها مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا معرفی شوند. ثانیا برای غربال هر توده اصلاحی از نشانگر (هایی) استفاده نمود که بیشترین درصد همخوانی را با نتایج مقاومت (براساس داده های الایزا و یا نمره آلودگی در

حدود ۳/۶ سانتی مورگان بود. نوحی و همکاران (۱۶) نیز با استفاده از روشی مشابه و با استفاده از نشانگر RAPD، موفق به شناسایی دو نشانگر به نام های OF-09 با اندازه ۱۱۵۰ جفت باز در وضعیت جفت و فاصله ۲۷ سانتی مورگان از ژن  $RzI$  و دیگری OP-AN9 با اندازه ۶۰۰ جفت باز در وضعیت ناجفت و با فاصله ۱۳/۷ سانتی مورگان از ژن  $RzI$  شدند. این نتایج عیناً توسط مصباح (۱۳) ارایه شده است. نوروزی و فقهی (۱۵) با استفاده از روش RAPD موفق به شناسایی نشانگرهای R1 و R2 به ترتیب در فواصل ۲/۳۲ و ۸/۳ سانتی مورگان از ژن  $RzI$  در فاز ناجفت و نشانگرهای C4 و C1 به ترتیب در فواصل ۲۱/۴ و ۲۷/۵ سانتی مورگان از ژن  $RzI$  در فاز جفت شدند. اما هیچ یک از محققان یاد شده، نشانگرها بدست آمده را به منظور تایید و تکرار پذیری آنها روی تعداد زیادی تک بوته از توده های مختلف مورد بررسی قرار ندادند. بنابراین در تحقیق حاضر بررسی تکرارپذیری عمدۀ نشانگرها ذکر شده در منابع علمی داخلی و خارجی که پیوستگی آنها با ژن  $RzI$  قبلاً گزارش شده بود در چندین توده اصلاحی و رقم تجاری حساس و مقاوم به ریزومانیا انجام گرفت که برخی از آنها تایید ولی عمدۀ آنها بجای نشانگر ذکر شده در منبع اولیه تولید نشانگر(های) دیگری نمودند. این مسئله می‌تواند برپایه نتایج بررسی های محققان زیر قابل توجیه باشد. گیوریو و همکاران (۸) برای تایید ۱۰ نشانگر RAPD پیوسته با ژن مقاومت هولی که قبلاً توسط بارزن و همکاران (۴) شناسایی شده بود از یک

نشانگرهای جفت PN1 و PN2 به ترتیب با نسبت توافق ۵۷ و ۷۱ درصد با نتایج الایزا، و نسبت حضور بیش از ۸۰ درصد در ارقام تجاری مقاوم جزو مناسب ترین نشانگرهای جفت بدست آمده باشند. خطای نوع اول یا  $\alpha$  (درصد بوته های حساس دارای باند نشانگر) برای دو نشانگر یاد شده حدود شش درصد بدست آمد (داده ها نشان داده نشده است) که برای غربال ژنتیک های مقاوم فاصله نسبتاً مناسبی می باشد. همچنین نشانگرهای جفت PN19 و PN13-2 به ترتیب با نسبت حضور ۸۹ درصد (جدول ۵) و ۱۰۰ درصد (جدول ۸) در گرده افshan ۲۰۳۲۲ قادر به شناسایی آلل مقاومت در این ژنتیک می باشند.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مدیریت محترم موسسه تحقیقات اصلاح و تهییه بذر چندرقند که امکانات اجرای این پژوهش را فراهم نموده اند کمال قدردانی و تشکر را داریم.

مزرعه) داشته اند. ثالثاً نشانگرهای معرفی شده در پروژه آتی به صورت نشانگرهای اختصاصی (SCAR) در آمده که جایگاه اتصال مشخص تری داشته باشند تا ضمن تکرارپذیری بیشتر از سهولت بیشتری نیز جهت به کارگیری در آزمایشگاه برخوردار شوند. با انجام این مهم می توان نشانگرهایی را که ارزش کاربردی بیشتری دارند مشخص نمود و امیدوار بود که نشانگرهای مولکولی مذکور بتوانند در مراحل تهییه رقم مقاوم به ریزومانیا، زمان و هزینه اصلاح را کاهش و دقت انتخاب تک بوتهها و در نتیجه سودمندی انتخاب را افزایش دهند. در این تحقیق نشانگرهای بدست آمده از تحقیقات قبل، روی تعدادی از توده های اصلاحی و ارقام تجاری مقاوم و حساس به ریزومانیا از منشاء Holly ارزیابی شده است. براساس این تحقیق برخی از نشانگرهای قبلی تایید گردید و تعدادی نشانگر جدید نیز با به کارگیری آغازگرهای مرتبط با نشانگرهای مورد بررسی بدست آمد. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می رسد

### منابع

1. Amiri, R. 2003. 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.
2. 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.
3. Anonymus. 2010. Utilization Statistics of sugar factories of Iran. [http://www.sbsi.ir/sugar\\_facts](http://www.sbsi.ir/sugar_facts).
4. 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.
5. 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.

- ۴۱ ..... چشم‌اندازی بر اثرات مکانیزم‌های انتقال و توزیع آفات و بیماری‌های کشاورزی در استان اصفهان
6. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
7. Draycott, A.P. 2006. Sugar Beet (World Agriculture Series). Wiley-Blackwell. London. 496 pp.
8. Giorio, G., M. Gallitelli and F. Cerriero. 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.
9. Grimmer, M.K., S. Trybush, S. Hanley, S.A. Francis, A. Karp and 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. Theoretical and Applied Genetics 114: 1151-1160.
10. 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.
11. Keskin, B. 1964. *Polomyxa betae* n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Archives of Microbiology 49: 348-374.
12. 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.
13. Mesbah, M. 2007. Identification of molecular markers linked to rhizomania resistance genes for evaluation of sugar beet germplasm. Final report of project. Sugar Beet Seed Institute. Registration No. 86/1305. 44 pp.
14. Norouzi, P. 2008. Identification of molecular markers linked to rhizomania resistance genes from Holly source. Final report of project. Sugar Beet Seed Institute. Registration No. 87/354. 67 pp.
15. Norouzi, P. and S.M.A. Feghhi. 2009. Identification of some RAPD molecular markers linked to rhizomania resistance gene in sugar beet. Proceeding of 6<sup>th</sup> National Biotechnology Congress of Iran. 112 pp.
16. Nouhi, A., R. Amiri, A. Haghnazari, J. Saba and M. Mesbah. 2008. Tagging of resistance gene(s) to rhizomania disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). African Journal of Biotechnology 7: 430-433.
17. 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* L.) by bulked segregant analysis. Plant Breeding 115: 371-377.
18. Scholten, O.E., R.M. Klein-Lankhorst, 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. Tamada, T. 1975. Beet Necrotic Yellow Vein Virus. C.M.I./ A.A.B. Descriptions of plant viruses, No. 144.
22. Toodehfallah, M., N. Arjomand and B. Mahmoudi. 2000. Investigation of infestation and dispersion of rhizomania disease of sugar beet in Iran. Proceeding of 14<sup>th</sup> plant protection congress of Iran. Esfahan Technical Univ. Esfahan. 72 pp.

## Repeatability of Some Molecular Markers Linked to Rhizomania Resistance Gene (*Rz1*) in Sugar Beet (*Beta vulgaris L.*) Genotypes

P. Norouzi<sup>1</sup>, S.B. Mahmoudi<sup>2</sup>, M. Aghaiezaheh<sup>3</sup>, M. Kakuei nezhad<sup>3</sup>, M.R. Orazizadeh<sup>3</sup>, S. Vahedi<sup>2</sup> and M.R. Fathi<sup>4</sup>

---

1- Assistant professor, Sugar Beet Seed Institute, Karaj (Corresponding author )  
2, 3 and 4- Assistant professor, Researcher Instructor and M.Sc. of Sugar Beet Seed Institute, Karaj

---

### Abstract

Rhizomania disease is one of the most important diseases of sugar beet in Iran and many other parts of the world, and plays an essential role in decreasing sugar yield in fields. The best approach to control this disease is to use resistant varieties. For the involvement of resistance genes in breeding programs, tagging these genes by molecular markers is necessary. In this approach, some breeding populations and commercial varieties of sugar beet originated from *Rz1* resistance source were used for validation and repeatability of some coupling molecular markers obtained from past studies. Accordingly, ELISA data related to greenhouse evaluation of rhizomania resistance were used in some breeding populations. For molecular analysis, leaf samples were taken from the plants and after DNA extraction, RAPD or PCR using related primers to markers were performed. Amplified products were separated by gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, observed using gel documentation device and scored according to presence and absence of marker bands. Percentages of agreement between the markers results with ELISA data in single plants were estimated in breeding populations and the percent presence of the markers in commercial varieties were determined. Comparison between ELISA and molecular analysis results showed that among these markers, two coupling markers named PN1 and PN2 with ELISA agreement proportion of 57% and 71% respectively, an  $\alpha$  error of 6% and presence of more than 80% in resistant varieties are the most suitable coupling markers to identify *Rz1* resistance allele.

**Keywords:** Sugar beet, Resistance, Rhizomania, Molecular marker, RAPD, PCR