دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تکرارپذیری برخی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا (*Rz1*) در ژنوتیپ های چغندرقند (*Beta vulgaris* L.)

پ. نوروزی[۱]، س. ب. محمودی[۲]، م. آقائی زاده[۳]، م.کاکوئی نژاد[۳]، م. ر. اوراضی زاده[۳]، س. واحدی[۳] و م. ر. فتحی[۴]

۱- استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند (نویسنده مسوول)
۲، ۳ و ۴- استادیار، مربی پژوهشی و کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند
تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۵

چکیده

ریزومانیا مهمترین بیماری چغندرقند 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. ردیابی ژن های مقاومت با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه های به نژادی ضروری است. در این تحقیق برای تایید و تکرارپذیری نه نشانگر مولکولی جفت، از چندین توده اصلاحی و رقم تجارتی چغندرقند که حامل ژن مقاومت Rz1 بودند استفاده شد. برای این منظور از داده های موجود الایزا 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 الایزای مربوط به تک بوته ها در توده های اصلاحی و نیز درصد حضور نشانگرها در ارقام تجارتی محاسبه گردید. مقایسه بین نتایج الایزا 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 ۵۷ و ۷۱ درصد با نتایج الایزا، خطای نوع اول شش درصد و نسبت حضور بیش از ۸۰ درصد در ارقام تجارتی مقاوم از نشانگرهای مناسب برای شناسائی آلل مقاومت Rz1 بودند.

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

مقدمه

اهمیت چغندرقند: چغندرقند یکی از دو محصول مهم تأمین کنندهٔ 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 تقریبا 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 (۷). میزان تولید ریشه چغندرقند در داخل کشور حدود چهار میلیون تن در سال قبل بوده است (۳).

بیماری ریزومانیا: مهمترین بیماری که گیاه چغندرقند را تهدید می کند ریزومانیا[1] می باشد که از مخرب ترین بیماری های چغندرقند است و می تواند حتی تا صد در صد 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 ریزومانیا یا BNYVV[2] (۲۱) توسط قارچی بنام پلی میکسا بتا[3] منتقل می‌شود (۱۱). تنها راه حفاظت محصول چغندرقند در مزرعهٔ آلوده به ریزومانیا، کشت ارقام مقاوم است. عمدتا دو ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندر قند شناسایی شده اند که از منابع مختلف منشأ گرفته و بصورت Rz_1 و Rz_2 نامگذاری شده اند (۲۰).

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 گریزند 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 گردند (۱۴).

نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن های مقاومت به ریزومانیا: پلسی و مردینوگلو (۱۷) از روش BSA[4] 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 طبقه بندی شدند. شولتن و همکاران (۱۸ و ۱۹)، نام Rz_1 را برای ژن Holly و نام Rz_2 را برای ژن (های) WB42 پیشنهاد نمودند. امیری (۱) گزارش نمود که مقاومت در منبع WB42 با یک ژن غالب (*Rz2*) کنترل می شود و فاصله آن از ژن *Rz1* در منبع Holly حدود ۳۵ سانتی مورگان

1- Rhizomania 2- Beet Necrotic Yellow Vein Virus 3- *Polymyxa beta* Keskin
4- Bulked Segregant Analysis

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

می باشد. امیری و همکاران (۲) با بررسی وراثت مقاومت به بیماری ریزومانیای چغندرقند 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 F_2 حاصل از تلاقی رگه های 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. لین و همکاران (۱۲) با استفاده از چهار آنالوگ ژن مقاومت از چغندرقند به نام های (cZR-1، 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 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 و تائید نشانگرهای منتخب جفت پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیای چغندرقند از منبع زراعی Holly از طریق مقایسه نتایج نشانگرها با نتایج آزمون الایزا و تعیین درصد حضور نشانگرها در ارقام تجاری مقاوم و حساس چغندرقند برای ارزیابی سریع ژرم پلاسم بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: ژنوتیپ‌های گوناگون چغندرقند شامل توده های اصلاحی S_1-A، S_2-A و S_1-B، FC، والد گرده افشان ۲۰۳۲۲، ارقام تجارتی حساس رجینا، 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 ژنوتیپ ها بین ۱۵۰-۲۰ 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 چغندرقند کرج بهینه سازی شده بود انجام شد (۲). **استخراج DNA:** استخراج DNA با روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (۶) انجام شد. **آزمون مولکولی RAPD –PCR:** واکنش زنجیره پلی مراز برای

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

انجام RAPD و PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش انجام گرفت. حجم مورد نیاز DNA در یک واکنش، ۱/۵ میکرولیتر با غلظت ۵۰ng/µl، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x، ۲ میکرولیتر dNTP ۲/۵ میلی مولار، ۱/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی مولار، ۱ میکرولیتر با غلظت ng/µl ۳۰ از هریک از دو آغازگر، ۰/۲ میکرولیتر(یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی مراز بود.

واکنش زنجیره ای پلی مراز برای 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 $34^{\circ}C$، توسعه به مدت ۱ دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ و یک مرحله ۱۰ دقیقه ای توسعه نهایی در دمای $72^{\circ}C$ برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش. همچنین واکنش PCR اختصاصی مشابه شرایط یاد شده در بالا با تفاوت در دمای اتصال آغازگر (۵۴ درجه سلسیوس) انجام شد. سپس محصولات واکنش RAPD یا PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ 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 Rz_1 در حالت ناجفت و جفت از روش بارزن و همکاران (۴) بصورت زیر استفاده گردید:

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

برای تعیین خطای نوع اول (بوته های حساس دارای باند نشانگر) از تقسیم تعداد بوته های حساس دارای باند نشانگر جفت به تعداد کل بوته های آزمون شده استفاده گردید. برای تعیین درصد توافق نتایج الایزا با داده های مولکولی از رابطه زیر استفاده گردید:

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

نتایج و بحث

نتایج آزمون الایزا: پس از انجام آزمون الایزا نمونه‌ای که دارای غلظت بیشتر ویروس در ریشه‌های خود است (فرد حساس‌تر) رنگ زرد پررنگ تری در چاهک های پلیت الایزا نشان می دهد و عددی که دستگاه الایزا خوان[1] آشکار می سازد بالاتر است. با اندازه گیری $\overline{X}$ 2 و $\overline{X}$ + 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 $\overline{X}$ 2 حساس(S)، با OD پایین‌تر از $\overline{X}$ + 3Sd مقاوم و غیرآلوده (R) در نظر گرفته شدند.

1- ELISA reader

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

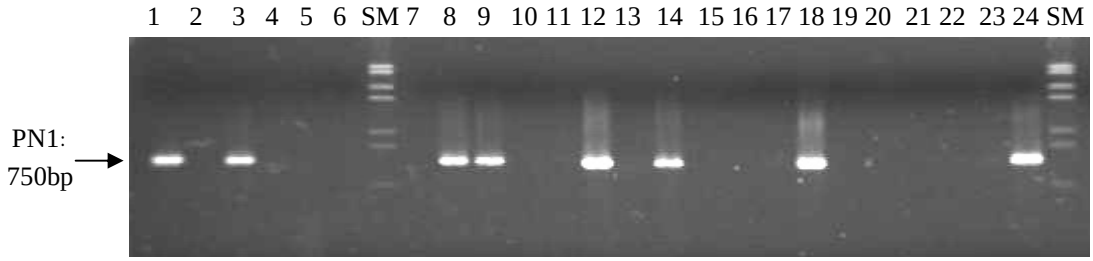
در توده‌هایی که الایزای آن‌ها مشخص شده بود، درصد توافق بین نتایج بدست آمده از آزمون الایزا و RAPD، محاسبه شد و در سایر توده‌ها تنها درصد حضور ژن تعیین گردید. برای تایید نشانگرهای منتخب در توده های اصلاحی، درصد توافق نشانگر با الایزا و در ارقام تجارتی درصد حضور یا عدم حضور نشانگر از اهمیت خاصی برخوردار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

نشانگر PN_1: باند مشاهده شده در ژنوتیپ های به کار رفته برای این نشانگر در اندازهٔ bp ۷۵۰ به حالت جفت بود. این نشانگر از یک جفت آغازگر ۱۸ نوکلوتیدی در آزمون PCR اختصاصی (STS) روی اکثر توده های اصلاحی S_1، S_2 و FC، ارقام تجارتی حساس (با نسبت ۱۷ درصد) و مقاوم (با نسبت ۸۴ 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 PN1 در ارقام فلورس و دوروتی ۱۰۰ درصد بود.

جدول ۱- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN1 در ژنوتیپ های مختلف چغندرقند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر	ملاحظات
۱	توده های اصلاحی S_1-A	۱۲۴	...	...	فاقد چندشکلی
۲	توده های اصلاحی S_2-A	۷۳	۴۱	...	...
۳	توده های اصلاحی S_1-B	۱۵۷	۶۴	...	...
۴	توده های اصلاحی FC	۴۲	...	۴۵	...
۵	گرده افشان ۲۰۳۲۲	۳۶	...	۵۳	...
۶	رقم فلورس	۱۶	...	۱۰۰	...
۷	رقم دوروتی	۱۵	...	۱۰۰	...
۸	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۱۲۶	...	۸۴	...
۹	ارقام تجارتی حساس**	۹۶	...	۱۷	...

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



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر جفت PN1 در برخی تک بوته های توده S_1-B
SM: نشانگر تعیین اندازه DNA (Lambda DNA /*Eco*RI+*Hin*dIII Marker).

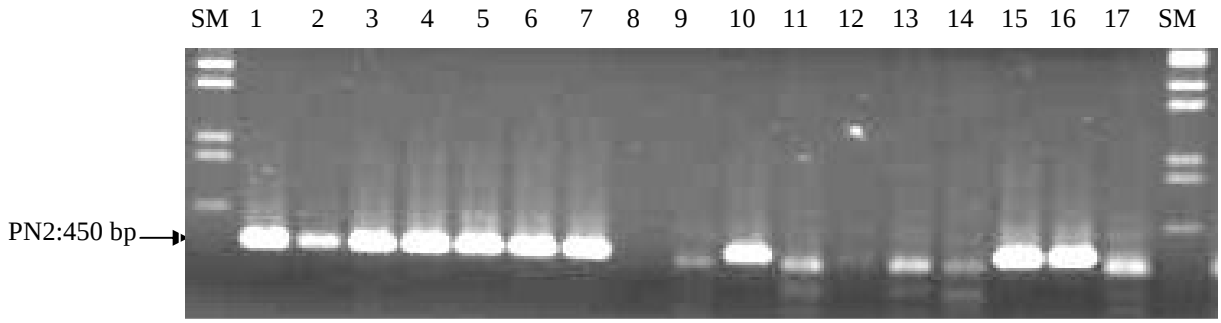
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

نشانگر PN2: باند مشاهده شده در ژنوتیپ های به کار رفته برای این نشانگر در اندازهٔ ۴۵۰ bp به حالت جفت بود. این نشانگر از یک جفت آغازگر ۱۸ و ۲۰ نوکلوتیدی در آزمون PCR اختصاصی (STS) روی اکثر توده‌های اصلاحی S_1، FC، ارقام تجارتی حساس (با نسبت ۱۶ درصد) و مقاوم (با نسبت ۸۳ درصد) بدست 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.

جدول ۲- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN2 در ژنوتیپ های مختلف چغندرقند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر	ملاحظات
۱	توده های اصلاحی S_1-A	۱۸	...	...	فاقد چندشکلی
۲	توده های اصلاحی S_1-B	۱۴	۷۱	...	...
۳	توده های اصلاحی FC	۴۲	...	۶۰	...
۴	گرده افشان ۲۰۳۲۲	۳۶	...	۵۳	...
۵	رقم فلورس	۱۵	...	۱۰۰	...
۶	رقم دوروتی	۱۴	...	۱۰۰	...
۷	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۸۳	...	۸۳	...
۸	ارقام تجارتی حساس**	۴۵	...	۱۶	...

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



شکل۲- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر جفت PN2 در برخی تک بوته های توده S_2-A (شماره ۱ تا ۴) و برخی تک بوته های توده S_1-B (شماره ۵ تا ۱۷)، SM: نشانگر تعیین اندازه DNA (Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker).

نشانگر PN11: باند مشاهده شده برای این نشانگر شامل ۱۳۶۰ bp جفت بود که به صورت PN11-1 نامگذاری شد. نشانگر PN11-1 روی هیبریدهای جدید 004، 005 و 006 موسسه آزمون گردید و نتایج آن به صورت جدول ۳ بدست آمد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

جدول ۳- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN11-1 در برخی هیبرید های چغندرقند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	هیبریدهای جدید موسسه*	۳۳	...	۳۰

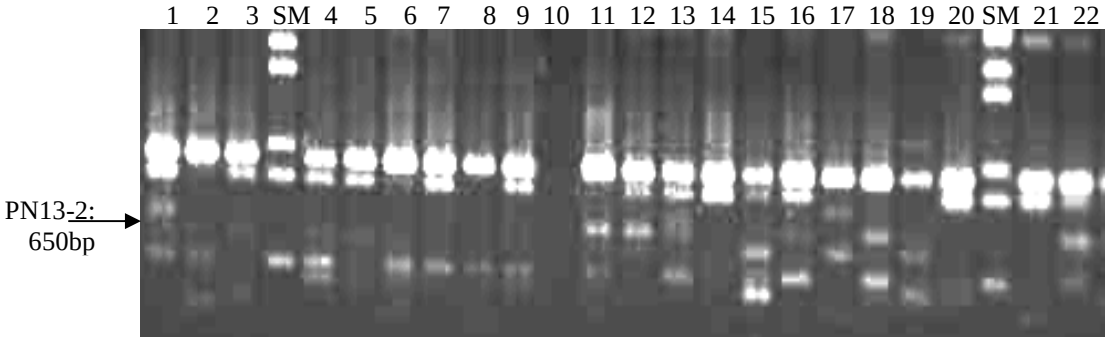
هیبریدهای جدید 004، 005 و 006.

نشانگر PN12: باند مشاهده شده در ژنوتیپ های به کار رفته برای این نشانگر در اندازهٔ ۶۲۰ bp به حالت جفت بود. این نشانگر روی توده های S_1، رقم تجارتی حساس رسول و مقاوم بریجیتا آزمون گردید و نتایج آن به صورت جدول ۴ بدست آمد.

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

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده های اصلاحی S_1-A	۱۶	۸۸	...
۲	رقم مقاوم بریجیتا	۵	...	۴۰
۳	رقم حساس رسول	۶	...	۱۷

نشانگر PN_{13}: باند مشاهده شده برای این نشانگر شامل ۶۵۰ bp جفت (به نام PN13-2) بود. الگوی باندی مربوط به نشانگر در شکل ۳ آمده است. این نشانگر روی هر یک از توده های اصلاحی S_1، S_2، توده های FC، ارقام تجارتی حساس و مقاوم آزمون گردید. درصد حضور و درصد توافق برای آن در جدول ۵ خلاصه شده است.



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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

جدول ۵- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN13-2 در ژنوتیپ های مختلف چغندر قند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	توده های اصلاحی S_1-A	۱۴	۹۳	...
۲	توده های اصلاحی S_2-A	۳۰	۶۷	...
۳	توده های اصلاحی S_1-B	۵	۰	...
۴	توده های اصلاحی FC	۱۵	...	۴۷
۵	یک توده S1 ازگرده افشان ۲۰۳۲۲	۹	...	۸۹
۶	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۴۵	...	۶۹
۷	ارقام تجارتی حساس**	۳۸	...	۵۳

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

نشانگر PN_{14}: باندهای مشاهده شده برای این نشانگر شامل ۹۰۰ bp جفت (به نام PN14-1) و ۱۰۰۰ bp جفت (به نام PN14-2) بود. دو نشانگر مذکور روی ارقام تجارتی حساس و مقاوم آزمون گردید. درصد حضور برای آنها در جداول ۶ و ۷ منعکس شده است.

جدول ۶- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN14-1 در ارقام تجارتی چغندرقند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۳۰	...	۲۳
۲	ارقام تجارتی حساس**	۳۵	...	۲۶

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

جدول ۷- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN14-2 در ارقام تجارتی چغندرقند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته‌های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	درصد حضور نشانگر
۱	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۳۲	...	۲۸
۲	ارقام تجارتی حساس**	۱۴	...	۲۹

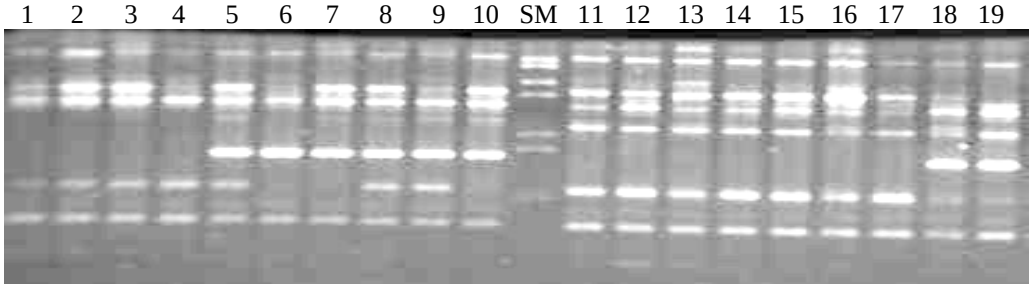
*: ارقام تجارتی مقاوم فلورس، دوروتی، بریجیتا و لاتیتیا. **: ارقام تجارتی حساس رسول، شیرین و رجینا.

نشانگر PN_{18}: اندارهٔ باند ظاهر شده در این نشانگر ۱۲۵۰ bp به صورت جفت بود. این نشانگر روی نمونه‌های گیاهی حساس و مقاوم توده S1 آزمایش شدند ولی نتایج آن فاقد هر گونه چند شکلی بود.

نشانگر PN_{19}: باند مشاهده شده برای این نشانگر در اندازهٔ ۸۲۰ bp به صورت جفت در والد گرده افشان ۲۰۳۲۲ و برخی ارقام تجارتی مقاوم دیده شد (شکل ۴). این نشانگر در هیچیک از توده های اصلاحی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

S_1، S_2 و تـوده هـای FC چنـد شـکلی نداشـت. نتـایج ایـن نشـانگر در جـدول ۸ آمـده اسـت. ایـن نشـانگر آلـل مقاومـت را در تـوده حاصـل از ژنوتیـپ ۲۰۳۲۲، رقـم فلـورس و لاتیتیـا بـه خـوبی شناسـایی و بـه صـورت یـک بانـد قـوی و واضـح مشـخص نمـود. ولـی ایـن نشـانگر قـادر بـه شناسـائی آلـل مقاومـت در ارقـام تجـاری مقـاوم بیریجیتـا و دوروتـی و تـوده هـای FC نبـود. در ارقـام حسـاس (شـیرین، رسـول و رجینـا) درصـد حضـور نشـانگر جفـت همـانطور کـه انتظار می رفت پایین بود.



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

جدول ۸- نتایج تکرارپذیری نشانگر جفت PN19 در ژنوتیپ های مختلف چغندرقند

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد بوته های آزمون شده	درصد توافق نشانگر با الایزا	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	...	۰	فاقد چند شکلی
۵	یک توده S1 ازگرده افشان ۲۰۳۲۲	۱۰	...	۱۰۰	...
۶	ارقام تجارتی مقاوم خارجی*	۳۶	...	۴۲	...
۷	ارقام تجارتی حساس**	۲۱	...	۵	...

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

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 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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 *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) ارایه شده است. نوروزی و فقهی (۱۵) با استفاده از روش 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 یاد شده، نشانگرهای بدست آمده را به منظور تایید و تکرار پذیری آنها روی تعداد زیادی تک بوته از توده‌های مختلف مورد بررسی قرار ندادند. بنابراین در تحقیق حاضر بررسی تکرارپذیری عمده نشانگرهای ذکر شده در منابع علمی داخلی و خارجی که پیوستگی آنها با ژن *RZ1* قبلا گزارش شده بود 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. این مسئله می تواند برپایه نتایج بررسی های محققان زیر قابل توجیه باشد. گیوریو و همکاران (۸) برای تایید ۱۰ نشانگر RAPD پیوسته با ژن مقاومت هولی که قبلا توسط بارزن و همکاران (۴) 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 شده و تکرارپذیری دارد. همچنین گریمر و همکاران (۹) 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 مورد بررسی تکرارپذیری داشته و مورد تایید قرار می گیرد و سایر نشانگرها با فواصلی که قبلا 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 می تواند بر الگوی باندهای RAPD اثر بگذارد.

البته لازم به ذکر است که اولا تایید نشانگرهای مذکور در تحقیق حاضر براساس میانگین چندین توده اصلاحی و یا ارقام تجارتی مقاوم و حساس چغندرقند بدست آمده است و در واقع برای اکثر نشانگرها در همه ژنوتیپ ها نتایج توافق و یا حضور کاملاً یکسانی بدست نیامده است. بنابراین به نظر می رسد در پروژهای آتی اولا ارتباط نشانگرهای مولکولی منتخب در این تحقیق با تعدادی ژنوتیپ که نمره آلودگی در مزرعه داشته باشند بدست آید تا بهترین نشانگرهای 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

مزرعه) داشته اند. ثالثا 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 تهیه 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 تجارتی 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 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 تجارتی مقاوم جزو مناسب ترین نشانگرهای جفت بدست آمده باشند. خطای نوع اول یا α (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 ژنوتیپ های مقاوم فاصله نسبتا مناسبی می باشد. همچنین نشانگرهای جفت PN13-2 و PN19 به ترتیب با نسبت حضور ۸۹ درصد (جدول ۵) و ۱۰۰ درصد (جدول ۸) در گرده افشان ۲۰۳۲۲ قادر به شناسایی آلل مقاومت در این ژنوتیپ می باشند.

تشکر و قدردانی

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

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. Ananymus. 2010. Utilization Statistics of sugar factories of Iran. 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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. Cerrioro. 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. *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.
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 6th 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-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. 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 14th plant protection congress of Iran. Esfahan Technical Univ. Esfahan. 72 pp.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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

P. Norouzi[1], S.B. Mahmoudi[2], M. Aghaiezadeh[3], M. Kakuei nezhad[3], M.R. Orazizadeh[3], S. Vahedi[2] and M.R. Fathi[4]

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 resitance 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 α error of 6% and presence of more than 80% in resistant varieties are the most suitable coupling markers to identify *Rz1* resistance allel.

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]