ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۳۱۱- ۳۰۱

بررسی امکان دستیابی به گزینش به کمک نشانگر برای صفت مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

مرضیه شازده احمدی[۱*]، سپیده ترابی[۲]، محمدرضا صلواتی میبدی[۳]، حمید عبداللهی[٤]، ملیحه ملکی[٥]، ناهیدمعرف زاده[٦]

۱و۲- دانشجوی کارشناسی ارشد واستادیار واحد علوم و تحقیقات تهران
۵،۳ و۶- محققین مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر
۴- استادیار، موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Noshinshazdeahmadi@Yahoo.com

(تاریخ دریافت:۹۰/۵/۱۰- تاریخ پذیرش:۹۰/۹/۸)

چکیده

توتون، یکی از گیاهان مهم زراعی و صنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولید کننده نقش بسیارمهمی دارد. بیماری ویروس Y سیب زمینی (PVY) یکی از مهمترین بیماری های ویروسی خسارت زا بر روی توتون می باشد و سبب کاهش کمیت و کیفیت محصول توتون می شود. بهترین و اقتصادی ترین روش کنترل بیماری PVY، تولید ارقام مقاوم است. اصلاح برای مقاومت به این بیماری از طریق روش های کلاسیک، مشکل و مستلزم صرف هزینه های زیادی است. نشانگرهای DNA پیوسته با ژن های مقاومت و دارای چندشکلی زیاد (مانند نشانگرهای SSR) می توانند در تسریع برنامه های اصلاح ارقام مقاوم مفید باشند. این مطالعه به منظور بررسی امکان دستیابی به گزینش به کمک نشانگر (MAS) برای صفت مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از نشانگر های SSR اجرا شد. بدین منظور در فروردین ماه ۱۳۸۹ کاشت بذور والدین، یعنی رقم VAM به عنوان والد مقاوم به PVY و رقم K326 به عنوان والد حساس به PVY، صورت گرفت. DNA والد مقاوم و والد حساس به بیماری PVY به طور جداگانه استخراج شد و ۱۰۰ جفت آغازگر SSR بر روی DNA والد مقاوم و والد حساس به طور جداگانه آزمون شدند و بعد از انجام الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره، از بین آنها ۲۸ نشانگر که دارای بیشترین چندشکلی بر روی والدین بودند، انتخاب و غربال شدند، سپس این ۲۸ نشانگر بر روی بالک مقاوم و بالک حساس به بیماری PVY مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۳ نشانگر SSR به نام های (PT20357)، (PT20165)، (PT30002) دارای بیشترین چندشکلی بر روی بالک های مقاوم و حساس به PVY بودند. این نشانگرها می توانند در امر گزینش به کمک نشانگر (MAS) در مقاومت به بیماری PVY در توتون مدنظر قرار گرفته و مفید باشند.

واژه‌های کلیدی

بالک،
توتون،
نشانگرهای SSR،
MAS،
PVY.

مقدمه

توتون یکی از گیاهان مهم زراعی وصنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولید کننده نقش بسیار مهمی دارد (khajepoor 2004). توتون گیاهی یکساله و از خانواده بادمجانیان و از جنس نیکوتیانا می باشد که به صورت بوته ای بزرگ و استوار رشد می کندو برای استفاده تجاری از برگهایش استفاده می شود(Ahifar 1998). ویروس Y سیب زمینی (PVY) متعلق به جنس پوتی ویروس است که گیاهان خانواده سولاناسه مانند سیب زمینی، توتون، گوجه فرنگی و فلفل را آلوده می کند(Tian et al. 2011).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

PVY یکی از مهمترین بیماری های ویروسی خسارت زا بر روی توتون است که لکه های نکروتیک یا (قهوه ای شدن رگبرگها)، نواری شدن رگبرگها، علائم موزاییکی و ایجاد نقاط حلقوی نکروزه برروی برگهای توتون از علائم آن است و باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول توتون می شود (shou et al. 1991;Reynolds 2011). میزان خسارت ویروس Y سیب زمینی بر روی گیاه توتون تا ۷۵ درصد ذکر شده است که به عوامل متعددی از جمله رقم توتون، زمان وقوع آلودگی و سویه ویروس بستگی دارد (Mahtabi,R 1999). بهترین روش کنترل بیماری PVY تولید ارقام مقاوم است، به همین دلیل شناسایی ژن های مقاومت به بیماری PVY با استفاده از نشانگرهای مولکولی، روشی سریع و راحت بوده و کمک زیادی به تولید ارقام مقاوم می کند (Dinant et al. 1993). یکی از بهترین و سریع ترین نشانگرهای مولکولی در بررسی چندشکلی، نشانگر SSR می باشد. نشانگرهای SSR در ژنوم تمام یوکاریوت ها وجود دارند (Li et al. 2010). SSR ها به دلیل فراوانی زیادشان برای مکان یابی ژنتیکی و مطالعه جمعیت، نشانگرهای ایده آلی هستندو استفاده از آنها بسیار ساده و آسان است(Naghavi et al. 2005). محل عامل مقاومت به بیماری PVY توسط Gupton and Burk (1973) بررسی شده است. آنها بین رقم ویرجینیا A جهش یافته به عنوان والد نر و ۲۴ مونوسومی توتون تلاقی انجام دادند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که احتمالا مقاومت به بیماری PVY در توتون، به یک ژن بر روی کروموزوم E مربوط می شود. (Rodal and xiong 2008) عملکردهای تکمیلی دو ژن مغلوب تعیین کننده دوام مقاومت به ویروس Y سیب زمینی را در توتون ویرجینیا A موتانت بررسی کردند. آنها دریافتند که توتون رقم VAM و رقم NC 745 حامل ژن *Va* هستند که این ژن سبب ایجاد مقاومت به بیماری PVY در توتون می شود. نتایج تجزیه و تحلیل ژنتیکی بر روی نتاج هیبرید نشان داد که مقاومت توتون رقم VAM نسبت به بیماری PVY، حداقل به وسیله دو ژن مغلوب به نام ژن *Va* و *Va2* تعیین می شود. (Davalieva et al. 2010) در بررسی تنوع ژنتیکی واریته های توتون ایالت Macedonian آمریکا از نشانگرهای SSR استفاده کردند. در این تحقیق از ۷۰ مارکر ریزماهواره (SSR) به دلیل داشتن سطوح بالای چندشکلی برای شناسایی ۱۰ واریته از توتون های کشت شده در ایالت Macedonian استفاده شد که از بین آنها ۱۴ مارکر دارای بیشترین چندشکلی بودند. آنها به منظور اندازه گیری تنوع ژنتیکی و هتروزیگوسیتی، شاخص شانون را محاسبه کردند. بیشترین مقدار این شاخص و بیشترین میزان تنوع ژنتیکی را آغازگر XAM07(1/5175) و کمترین میزان آنرا آغازگر XAM13(0/5623) به خود اختصاص داد. Czubacka and Doroszewska (2009) ، در نتیجه تحقیقات خود، توتون دابل هاپلوئیدی را ایجاد کردند که دارای منابع مختلف مقاومت به بیماری PVY می باشد. آنها دریافتند که یکی از منابع مقاومت به PVY، گونه وحشی توتون به نام *Nicotiana africana* می باشد. منبع دیگر مقاومت به PVY، لاین های ترانسژنیک توتون به نام (MN 944-LMV) و کولتیوار Mac Nair هستند که دارای ژن پروتئین پوششی *LMV* یا (*LMV CP*$^{+}$) هستند. Bindler et al (2007) نقشه ژنتیکی عظیمی از توتون (*Nicotiana tabacum* L.) را با استفاده از نشانگرهای SSR ایجاد کردند. این مطالعه با استفاده از ۲۱۰ مارکر SSR و با هدف ایجاد نقشه ژنتیکی بسیار بزرگی از توتون برای ایجاد ژنوم تتراپلوئید انجام گرفت. این نقشه ژنتیکی با استفاده از مکان یابی جمعیت به دست آمده از تلاقی بین واریته ای Hicks Broad Leaf × Red Russian انجام شد. (Brigenti et al. 1998)، با استفاده از نشانگرهای AFLP، مکان یابی مولکولی ژن مقاومت به بیماری PVY (ژن *Ry sto*) در گیاه سیب زمینی را بررسی کردند. آنها دریافتند که ژن *Ry sto* یک ژن غالب است که مقاومت به بیماری PVY را در گیاه سیب زمینی ایجاد می کند. Sabir (2010) از مارکر RAPD و مارکرهای پروتئینی برای بررسی مقاومت به ویروس Y سیب زمینی در کولتیوارهای سیب زمینی استفاده کردند. آنها برای انجام تحقیق خود، ۹ کولتیوار سیب زمینی را در ۳ فصل متوالی کاشتند و با انجام تست الیزا آنها را بر حسب ظهور علائم آلودگی به PVY طبقه بندی کردند.آنها در این تحقیق از روش (SDS-PAGE) و ۶۰ مارکر RAPD برای شناسایی کولتیوارهای مقاوم و شناسایی نشانگرهای پیوسته به بیماری PVY استفاده کردند. مشخص شد که از بین آنها، ۴ نشانگر چندشکلی بالایی (در حدود ۷۵ درصد) را نشان دادند، به طوریکه نشانگر (XZ 33) دارای بیشترین درصد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

چندشکلی (۹۰ درصد) و نشانگر (XZ61) دارای کمترین چند شکلی (۴۰ درصد) بود (Yao Zhang et al. 2008)، تنوع ژنتیکی کولتیوارهای توتون را توسط مارکرهای RAPD و AFLP بررسی کردند. ارزیابی تنوع ژنتیکی کولتیوارهای توتون در اصلاح و بهبود عملکرد توتون در دراز مدت اهمیت دارد. آنها روابط خویشاوندی کولتیوارهای توتون را توسط تجزیه خوشه ای (UPGMA) بر پایه داده های RAPD و AFLP برآورد و تخمین زدند. Keiichi and Akira (2004) ، یک نژاد جدید از ویروس Y سیب زمینی را در توتون بارلی در ژاپن کشف کردند. دو ایزوله A-1 و A-2 بر روی برگهای توتون بارلی ایجاد لکه های زرد یا نقاط حلقوی نکروزه قهوه ای و علائم سیستمیک می کنند. آنها در این تحقیق، محل های غیرفعال برگ نسبت به PVY را با ایزوله های A-1 به مدت ۱۰ دقیقه آلوده کردند و آنها را ۶-۵ روز در محیط *in vitro* قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که آنتی سرم تهیه شده به وسیله ایزوله A-1، واکنش مثبت نسبت به آلودگی نشان داد. مشخص شد که ایزوله A-1 از ویروس Y سیب زمینی به گروهی از نژادهای نکروتیک PVY تعلق دارد. (Hu et al 2009) ، در نتیجه تحقیقات خود دریافتند که یک نژاد نوترکیب جدید از PVY، ایجاد عوامل ژنتیکی جدید ویروسی و نکروز آوندی برروی توتون می کندو لاین L26 دارای علائم موزاییکی و روشن شدن رگبرگها برروی توتون می باشد و نژاد PVY NTN ایجاد نکروز آوندی بر روی توتون می کند. مشخص شد که دو آمینواسید از ژنوم آنها در ایجاد علائم نکروز آوندی در توتون نقش دارند که این دو آمینواسید در ناحیه C -ترمینال از HC-Pro این جدایه قرار دارند. نشانگرهای مولکولی پیوسته به صفات مهم زراعی ،بازده اصلاح این گیاهان را به طور قابل ملاحظه ای افزایش داده است (Naghavi et al. 2005). نشانگر مولکولی برای یک ژن خاص، قسمتی از DNA است که کاملا به یک ژن پیوسته می باشد. بنابر این هر گیاه که حاوی یک نشانگر خاص باشد، حاوی ژن پیوسته به آن نیز خواهد بود(Najafi et al. 2009). چنانچه صفاتی مانند مقاومت به بیماری ها را بتوان به وسیله پیوستگی با نشانگرهای مولکولی نشانمند نمود، زمان و هزینه لازم برای انتقال این ژن ها از یک زمینه ژنتیکی به دیگری و بنابر این بهبود ارقام مقاوم به شدت کاهش خواهد یافت (Fuentes et al. 2000). چنانچه پیوستگی شدیدی بین مکان ژنی نشانگر و مکان ژنی کنترل کننده آن وجود داشته باشد، اصلاحگران می توانند از نشانگرهای مولکولی جهت انتخاب غیر مستقیم افراد در جمعیت های در حال تفرق که ژن را برای یک صفت مطلوب حمل می کنند، استفاده کنند (Cernak et al. 2008). هدف از این تحقیق، بررسی امکان دستیابی به انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای صفت مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از مارکرهای SSR بود.روش انتخاب به کمک نشانگر در کنار ارزیابی چندشکلی والدین و همچنین ارزیابی چند شکلی بالک های مقاوم و حساس به بیماری PVY در توتون، یک راهبرد کارا برای تسهیل ژن های مقاومت به شمار می رود، زیرا در مقایسه با تعیین ژنوتیپ جمعیت با تعداد زیادی از نشانگرها ، موجب صرفه جویی در زمان و هزینه می شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل برگ های جوان گیاهان مقاوم به بیماری PVY (رقم VAM) و رقم حساس به بیماری PVY (رقم K326) در توتون بود. بذور این گیاهان در فروردین ۱۳۸۹ در گلخانه کشت شد و در مرحله ۳ برگی از آنها نمونه گیری انجام شد. نمونه ها در ازت مایع منجمد شد و در فریزر۸۰- نگهداری شد. سپس از تلاقی رقم VAM × رقم K326 در مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، یک جمعیت F2 تهیه شد و ۱۰۰ بذر F_2 حاصل از تلاقی رقم VAM×K326 در خزانه کاشته شدند و با عصاره ویروس Y سیب زمینی مایه زنی شدند و با انجام تست الایزا و بررسی و تایید کامل مقاومت و حساسیت بوته های F2 نسبت به بیماری PVY، تعداد ۱۰ بوته کاملا مقاوم و ۱۰ بوته کاملا حساس به PVY انتخاب شدند و از هر کدام از آنها به طور جداگانه نمونه برگ تهیه شد.

استخراج DNA

DNA ژنومی از برگ های والد مقاوم و والد حساس به بیماری PVY و همچنین DNA ژنومی از برگ های هریک از ۱۰ بوته کاملا مقاوم و ۱۰ بوته کاملا حساس به بیماری PVY به طور جداگانه با استفاده از روش (Delaporta et al. 1983) استخراج

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

شد. برای استخراج DNA در حدود ۳-۲ گرم برگ از هر نمونه تهیه شد. برگها با نیتروژن مایع در هاون چینی ساییده شدند و مقداری از برگهای ساییده شده به میکروتیوب های ۱/۵ ml منتقل شد. سپس مقدار ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج مخصوص دلاپورتا که از قبل در بن ماری تا دمای $65^{\circ}C$ گرم شده بود به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه ها مدت۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شدند و در این مدت هر ۱۰ دقیقه به آرامی با دست تکان داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار اضافه شد و میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $4^{\circ}C$ قرار گرفتند. سپس DNA توسط محلول کلروفرم : ایزوآمیل الکل جدا شد و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند و محلول روئی آنها دور انداخته شد.سپس، DNA ها با الکل اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند و به مدت ۲-۱ ساعت در معرض دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند. در آخر برای حل شدن کامل DNA، رسوب های حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شدند. سپس، میکروتیوب ها به مدت یک شب در یخچال معمولی در دمای $4^{\circ}C$ قرار داده شدند. پس از حل شدن کامل DNA، برای ارزیابی کمیت DNA، غلظت های DNA استخراج شده والد مقاوم و والد حساس به PVY، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و با طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتراندازه گیری و تعیین شد. ارزیابی کیفیت DNA های استخراج شده توسط الکتروفورز افقی ژل آگاروز ۰/۸ درصد انجام شد.

تست الیزا

بعد از انتقال نشاهای گیاهان F_2 به زمین اصلی و رسیدن به مرحله ۵-۴ برگی، مایه زنی با عصاره ویروس Y سیب زمینی صورت گرفت. ارزیابی گیاهان مایه زنی شده هر هفته یکبار تا یک ماه پس از مایه زنی انجام شد. جهت تایید آلودگی یا عدم آلودگی بوته ها به PVY، بوته ها با آزمون دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) مطابق روش(1977) Kelark and Adamz با استفاده از آنتی بادی چند همسانه ای (POLYCLONAL) ویروس Y سیب زمینی مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا آنتی بادی پلی کلونال IgG در بافر پوششی حل شده و به وسیله میکروپیپت، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر یک از چاهک های پلیت الایزا افزوده شد. بعد از نگهداری در دمای $37^{\circ}C$، آنتی بادی پلی کلونال اضافه با برگرداندن سریع پلیت الایزا خارج شد و چاهک ها ۳ بار و هر بار به مدت ۵-۳ دقیقه با بافر PBST (phosphate Buffer Saline Tween 20)شستشو داده شدندو سپس خشک شدند. سپس به هر یک از چاهک های پلیت الایزا ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بافت آلوده اضافه شد و در تعدادی از چاهک ها فقط بافر استخراج، در برخی گیاه آلوده به عنوان شاهد مثبت و در برخی گیاه سالم به عنوان شاهد منفی ریخته شد. بعد از یک شب نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ ، پلیت خالی شده و طبق مراحل قبل شستشو داده شد. آنتی بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز در بافر کانجوگه(conjugate) حل شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک پلیت افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شد. سپس یک میلی گرم در یک میلی لیتر از محلول پارانیتروفنیل فسفات در بافر زمینه تهیه شد و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد و تا ظهور رنگ زرد در برخی از چاهک ها در دمای اتاق نگهداری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از نشانگرهای SSR توتون

برای ایجاد بهترین شرایط PCR، غلظت های مناسب نمک، آغازگر و DNA توسط آزمون گرادیان غلظت تعیین گردید.حجم کلی واکنشPCR ۲۵ میکرولیتر می باشد که شامل یک میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ ng/µl)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۰/۲۳ میکرولیتر (۴۶ میلی مولار) آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از PCR buffer، ۱۵/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۱/۵ میکرولیتر آغازگر مربوط به هر یک از مارکرهای SSR توتون. (اسامی ۱۰۰ آغازگر SSR و توالی های آنها در جدول ۱ آورده شده است). این مواد به طور جداگانه به هر یک از تیوب های کوچک ۰/۲ ml منتقل شدند و در داخل دستگاه PCR قرار گرفتند. DNA استخراج شده هر یک از والدین مقاوم و حساس، به طور جداگانه توسط ۱۰۰ نشانگر توتون مورد آزمون PCR قرارگرفتند.برنامه PCR شامل دناتوره کردن ابتدایی در $94^{\circ}C$ برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ سیکل تکثیری شامل مرحله دناتوره کردن در $94^{\circ}C$ برای یک دقیقه، اتصال آغازگر در $55^{\circ}C$ برای ۴۵ ثانیه، تکثیر DNA در $72^{\circ}C$ برای یک دقیقه و بعد از آن مرحله تکثیر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

نهایی در $72^{\circ}C$ برای ۸ دقیقه انجام شد (لازم به ذکر است که دمای مرحله اتصال آغازگر برای هر نشانگر با توجه به توالی آن در نظر گرفته شد) و بعد از اتمام مراحل PCR، مقدار ۷ میکرولیتر از محصولات PCR به اضافه ی ۱/۵ میکرولیتر رنگ بارگذاری درون چاهک های ژل آگاروز ۱/۵ درصد ریخته شد و در ولتاژ ۷۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند، سپس ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و کیفیت باندهای آن بررسی گردید.

الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی ژل

فرآورده های PCR ۱۰۰نشانگر SSR توتون که به طور جداگانه با DNA هر یک از والدین مقاوم و حساس انجام شده بود بر روی ژل های پلی آکریلامید واسرشته ساز ۶ درصد الکتروفورز شدند و در آخر بر روی شیشه ها توسط مراحل مختلف رنگ آمیزی، باندهایی مربوط به الگوی چند شکلی نشانگر های SSR در بین والدین مقاوم (R) و حساس (S) در کنار یکدیگر ظاهر شد و چند شکلی آنها بررسی شد(شکل ۳). سپس، همین کار با ۲۸ نشانگر SSR توتون بر روی بالک های مقاوم و حساس انجام شدو چند شکلی نشانگر ها بررسی شد.

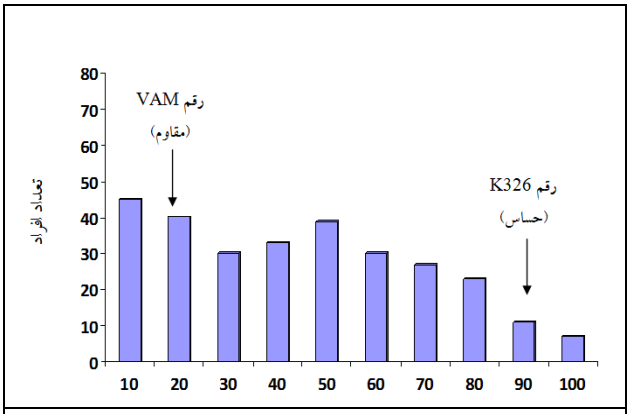
نتایج و بحث

ارزیابی مورفولوژیکی بیماری PVY در والدین و در نتاج F_2

ارزیابی بیماری PVY بر روی ارقام مقاوم و ارقام حساس هر ۱۰ روز یکبار انجام گرفت. والدین از نظر شدت بیماری تفاوت معنی دار نشان دادند، به طوریکه والد مقاوم (رقم VAM) دارای کمترین میزان شدت بیماری بود و والد حساس (رقم K326) دارای بیشترین میزان شدت بیماری PVY بود. سه عامل محیطی افزایش دما، رطوبت و نور، عوامل موثر و مهم در شروع و گسترش بیماری PVY در توتون هستند. همچنین شدت بیماری PVY در نتاج F2 دارای توزیع پیوسته و دامنه ای بین ۴ تا ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده تنوع فنوتیپی وسیع در این جمعیت بود (شکل ۱).

ارزیابی بیماری PVY با تست الایزا در نتاج F_2

نتایج آزمون الایزا بر اساس تغییر رنگ چاهک ها (از بی رنگ تا زرد رنگ) پس از ۳۰ الی ۱۲۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا بررسی و ثبت گردید، به طوریکه چاهک های بدون رنگ پلیت، نشان دهنده پاسخ منفی واکنش نسبت به PVY بود و چاهک های زرد رنگ پلیت، نشان دهنده پاسخ مثبت واکنش نسبت به PVY بود (شکل ۲).



شکل۱- توزیع فنوتیپی شدت بیماری PVY در گیاهان F_2 در بین ارقام مقاوم و حساس



شکل ۲- نتایج ارزیابی بیماری PVY با تست الیزا در نتاج F_2

تجزیه نشانگرهای SSR با انجام الکتروفورز عمودی

پس از رنگ آمیزی و ثبت ژل ها، اطلاعات به دست آمده برای هر جفت آغازگر با توجه به وجود و عدم وجود هر باند امتیاز دهی انجام شد. نتایج نشان داد که از بین ۱۰۰ جفت آغازگر مورد استفاده که فرآورده های PCR آنها، بر روی ژل پلی آکریلامید واسرشته ساز ۶ درصد الکتروفورز شده و ژل ها با محلول نیترات نقره رنگ آمیزی شدند، تنها ۲۸ جفت آغازگرSSR توانستند الگوی نواربندی متفاوتی را برای هر نشانگر در بین والدین مقاوم و حساس به PVY نشان دهند. (اسامی این نشانگرها و وزن آلل های آنها در جدول۲ آورده شده است و در شکل ۱ الگوی چند

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

شکلی آنها مشخص شده است.) با بررسی فرآورده های PCR ۲۸ نشانگر SSR توتون که بر روی بالک های مقاوم و حساس آزمون و الکتروفورز شده بود، با عکس برداری از آنها و بررسی چند شکلی باندها مشخص شد که تنها ۳ مارکر SSR به نام های (PT20357)، (PT20165)، (PT30002) دارای چندشکلی مناسبی برروی بالک (توده)های مقاوم و حساس بودند که این ۳ نشانگرمی توانند به عنوان شاخص برای تحمل و مقاومت به بیماری PVY در توتون مدنظر قرار گیرند. (این نشانگرها در شکل ۲ مشخص شده اند.)

جدول ۱- فهرست و مشخصات صد نشانگر SSR توتون مورد استفاده در این تحقیق :

ردیف	نام آغازگر	توالی رفت (F)	توالی برگشت (R)	دمای اتصال(°C)
۱	PT30280	5′-AATTCGACGACACTTGC-3′	5′-CCATATCTCACAGCAATCG-3′	٦٠
۲	PT20445	5′-ATGGCAAATGTTGCATCTC-3′	5′-CAAGACATGTGTCAACTGAA-3′	٦٠
۳	PT30001	5′-CATATGCTTCGGAGAGTTG-3′	5′-TCATTCGGTTGAGTACCTTAG-3′	٦٠
٤	PT30468	5′-AATATTGTGCTTGTGTAGGT-3′	5′-GGCTTAAGCACAAGCAGA-3′	٦١
٥	PT30484	5′-TCGATTCCAGACTTCCTCC-3′	5′-TGGCCTTAGCCACTGTCC-3′	٥٩
٦	PT11903	5′-CCATAAGTCCAACATGC-3′	5′-CCTGTAACATCTGAGTGCC-3′	٥٦
۷	PT20149	5′-AACAGAACCGGCAAGTC-3′	5′-TCCAACAAGATGCTTTCA-3′	٥٢
۸	PT40010	5′-CCATCCATGCTGCTGATA-3′	5′-GCGTGAAGCAACTAGAGA-3′	٦٣
۹	PT30180	5′-GATGATTCAAGTCTACTCA-3′	5′-CCATCCATTGCTGCTGAT-3′	٦٣
۱۰	PT20275	5′-AACAGCACCCAGCATT-3′	5′-GTTCTATTGATCGCCAT-3′	٥٢
۱۱	PT20165	5′-GGAATGGAGGATCTTCGT-3′	5′-TGTCTCGTGAAGCATGAA-3′	٥٢
۱۲	PT20211	5′-GGGTTATTCGAATCGGT-3′	5′-CGCTTGAAGGTTACAGGA-3′	٥٢
۱۳	PT30087	5′-TTGATGATAGACGAAG-3′	5′-CTTCTAAGCCGAGGT-3′	٦٠
۱٤	PT30184	5′-TTTCCTCATGCATACCAAT-3′	5′-CCCATTCCTTGTTCTA-3′	٦٠
۱٥	PT1300	5′-GGAGCAAGACTCCACCT-3′	5′-ACAGACGGTAGACCTCC-3′	٥٧
۱٦	PT20176	5′-GATGGCATCTGTGAAGC-3′	5′-TGCAAGATCCGTTGTAG-3′	٥٢
۱۷	PT30170	5′-TTTAAGCTCATTGAGCCG-3′	5′-CGTAATGAGATTATATGCCTT-3′	٦٤
۱۸	PT30391	5′-TGTTAAGGTATCATGTCGAT-3′	5′-TCCGGTCGTGAAATCTGT-3′	٦٣
۱۹	PT30388	5′-CCTTATTACCTCAGATACAA-3′	5′-TCCATTGCAGACATAATCC-3′	٦٠
۲۰	PT30425	5′-CATAAGCATGCCACGAT-3′	5′-TCATGGTGTATAGCTGA-3′	٥٦
۲۱	PT1078	5′-AGCCCATCGTGTCAA-3′	5′-CATTGCGAGTGATTTCGT-3′	٥٦
۲۲	PT1063	5′-AGCGTTAGAAACTAGATA-3′	5′-AGTCGTTAGAACTAGATAG-3′	٥٢
۲۳	PT30473	5′-TCAGCAACATCAGGAACA-3′	5′-TGCCCAGTAGGACAAGA-3′	٦٠
۲٤	PT20213	5′-TGTGGAGCTCCTTCTTGC-3′	5′-TCAATCACAAATCAAT-3′	٥٦
۲٥	PT1289	5′-GGGCTGTCCGTAAGTT-3′	5′-ATAGTCGACGTGCGCTCAC-3′	٥٢
۲٦	PT30468	5′-GGCTTTAAGCAAGCAGAA-3′	5′-AATTATTGTGCTTGTGTAAT-3′	٦٠
۲۷	PT30002	5′-CCATTCTCCACAAGTCAA-3′	5′-TGCGATGAATATCGAGGTGA-3′	٥٦
۲۸	PT20286	5′-CAAGATCCAGGCTCATCA-3′	5′-TCGACACTGCTTCGAT-3′	٥٣
۲۹	PT1244	5′-ACGATGGAGATCGTGTG-3′	5′-CCCAGATACCAACTCAGC-3′	٥٢
۳۰	PT20357	5′-GGGTTGTAATGGTGCTGGA-3′	5′-CCGAGCAAGCTATTTGAAT-3′	٥٩
۳۱	PT30160	5′-GCCGAATACCCAATCGC-3′	5′-ACCGGATTGCTTAATGTCG-3′	٥٢
۳۲	PT30018	5′-AATTACTGTGCTGTAAGTAC-3′	5′-TCATTCAGAAGCATATATTG-3′	٦٣
۳۳	PT30046	5′-GATAGGTAGATACCTGTT-3′	5′-GGTGCTAGCAACATCATCAA-3′	٦٣
۳٤	PT30480	5′-AAAGGAACATGGACATTG-3′	5′-TAGGCGAGATTGTGAATC-3′	٥٦
۳٥	PT30250	5′-GAACACGTTGCTCATTGC-3′	5′-ATAAGTCCTTAATTAATG-3′	٦٠
۳٦	PT40023	5′-TTCGTATATGCGCAA-3′	5′-AAGCATTTGTGTACAT-3′	٦٠
۳۷	PT30248	5′-TGGTTTGCAATGTTCGAAG-3′	5′-CATCCGATCGAGATTTAC-3′	٥٢
۳۸	PT40009	5′-GGTCACCTGCTCTCGAG-3′	5′-CCCAAATTATCACGCAAC-3′	٦٠
۳۹	PT30314	5′-TTGAGACATACAAGCGCA-3′	5′-GCAGACCCAGGATGTGTA-3′	٦٠
٤٠	PT20291	5′-AAACAACTTCACGCCTCG-3′	5′-ACGTCATAACAGCTCACC-3′	٥٢
٤١	PT30173	5′-CCCATGGTACAGAGTATCC-3′	5′-TCACATAATCTCGATCGCC-3′	٦٠
٤٢	PT20287	5′-CGCCAACACAACTCACTTA-3′	5′-TCATGCATGTTTCTTCCTCTT-3′	٥٩
٤٣	PT20372	5′-CCTTTACCTCACATTTGCAG-3′	5′-TAGGCTGATAGGATAGGTGC-3′	٦٠
٤٤	PT30197	5′-TTGTCTATCTGCCATGTCTC-3′	5′-AAGCTGCTAGTTCTACCGA-3′	٦٠
٤٥	PT30185	5′-TGGCTGCTAGACATGGATG-3′	5′-TGCTCTTCATCCACCACGAAC-3′	٥٩
٤٦	PT30161	5′-GCGAATCTAATGCGACTAT-3′	5′-TTGCATTATCTAATGCGACT-3′	٦٠

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

ردیف	نام آغازگر	توالی رفت (F)	توالی برگشت (R)	دمای اتصال(^{o}C)
٤٧	PT30028	5′-AAACTTGAAGCAGAGACGG-3′	5′-GCACATGCGATCTTGATT-3′	٦٠
٤٨	PT30186	5′-GAGCCAGACAGAGCAAGA-3′	5′-GATGAATAGCTCTGAATGC-3′	٦٠
٤٩	PT30355	5′-AAGCAGAGCATTAGATGGA-3′	5′-TCCGGATCATACATTGTTGG-3′	٦٠
٥٠	PT1194	5′-CTAATCACATGGACGAC-3′	5′-GAGTCCAATGACGAACG-3′	٥٢
٥١	PT30123	5′-TGATCCTGACGCCTACTT-3′	5′-GAATTCTACCAGCTGCCCA-3′	٥٨
٥٢	PT30378	5′-TCAATGAGGTTGTAGCCA-3′	5′-TGCATGGCTACACAAGAAG-3′	٥٨
٥٣	PT1069	5′-TGTGTTTAGGTTCCTGT-3′	5′-TTCTTCATTCACTACTTGTCA-3′	٦٣
٥٤	PT30332	5′-AAACCGAACCGAACTGATT-3′	5′-TCAATTTATGATTCTTGTACG-3′	٥٩
٥٥	PT30144	5′-TGATTGTATTGACAGCTAC-3′	5′-TTGTTAGTTACCTATTGACTT-3′	٦٣
٥٦	PT30446	5′-TGTCAAACGCAGTTGTGAG-3′	5′-TGTTCATTTGGGTGTAAGG-3′	٥٩
٥٧	PT20459	5′-TCATCTGACTCTTCGA-3′	5′-TCGAGCACCAAGATA-3′	٥٢
٥٨	PT30350	5′-TTTGAATGCACATTAAGCTC-3′	5′-AAAGCTATGCAAGACCAAGA-3′	٦٠
٥٩	PT1085	5′-AGCATGTTTGTCCGGTGCT-3′	5′-TGGCAACACCTCAGGCTA-3′	٥٩
٦٠	PT30320	5′-TCGTGAATTATTGAACGCC-3′	5′-CACCAATAATTGGAGATGA-3′	٥٩
٦١	PT30422	5′-AATGCCACTACGACATCTAT-3′	5′-TGAAGCGTTAACGGCAATT-3′	٦٠
٦٢	PT30399	5′-TGTGTGCACCCTCCAATTA-3′	5′-TGATCTAGAGTGGCATC-3′	٥٩
٦٣	PT30156	5′-GGCAACTTCTTCTTGGCA-3′	5′-GGATGAACAGACAGGGACA-3′	٦٠
٦٤	PT30214	5′-TCATATTGGAAGCACAGCA-3′	5′-TCATATTGGAAGCACAGCA-3′	٥٢
٦٥	PT30175	5′-TTAGGCGGCGGTATTCTTAT-3′	5′-TATGCCTCAATCCCTTACGC-3′	٦٠
٦٦	PT20397	5′-GGAAGCAGAGGTTGGAGA-3′	5′-TTGAGCCTTGGTCTCATGAT-3′	٥٩
٦٧	PT30111	5′-AGCCAGCACCAGTTATC-3′	5′-GGAACATGCTCAAGCCTA-3′	٥٩
٦٨	PT30285	5′-CATCATGGCAAGTCACATC-3′	5′-TGCTGGAAATAGCGAGTG-3′	٥٩
٦٩	PT30163	5′-CAACACACGCTCACTAGA-3′	5′-TCCTCATCCGCTAAAGG-3′	٦٠
٧٠	PT30411	5′-AACGCGGTATCGTAAGACT-3′	5′-CAATCACAATCAGAATTGAG-3′	٥٩
٧١	PT30845	5′-ACAGTCGGATCTCACCGT-3′	5′-TTCATGAATTGCTCGATGC-3′	٥٦
٧٢	PT30259	5′-CAGCCAAGAGAACCTTCAG-3′	5′-GATTACCTTCAATGCCGA-3′	٦٠
٧٣	PT30387	5′-GAGTTTGTAGCGGGCAAT-3′	5′-TAGCCATGCAAACTTGACA-3′	٥٩
٧٤	PT20286	5′-ACGCTAGAGCATCCAACA-3′	5′-TAGTGAAAGGCCAGCAGG-3′	٥٦
٧٥	PT30478	5′-ATTTGACTCGACCTGCGAA-3′	5′-CGTCACTTCAATACACATCA-3′	٥٩
٧٦	PT30455	5′-CAGTTCCGAATGATGACCG-3′	5′-TGGGCCTATGCTTCAGACT-3′	٦٣
٧٧	PT10466	5′-TTGCATTCTCCCTTATCG-3′	5′-CGAATCTCAGCCATTCTG-3′	٥٢
٧٨	PT30337	5′-TAAAGCACCTCACCTGACC-3′	5′-CCTCAAGATCCCAGATTCAA-3′	٥٦
٧٩	PT20168	5′-TAGGTTCCTCCTTCTCG-3′	5′-CCCGATCCAAAGAGAT-3′	٥٢
٨٠	PT30327	5′-TTGCAGCACACTATACAGT-3′	5′-GGTTCAGAGATGGAAGCCA-3′	٦٠
٨١	PT30067	5′-AAGCCTGGTCAGTTATCCA-3′	5′-ATTCGCACCACTTAATCC-3′	٥٦
٨٢	PT20172	5′-ACACCTCCTTCTTTGC-3′	5′-CCAAATGGTTCACTGGA-3′	٥٢
٨٣	PT30308	5′-ATTGGGCAAATTGTAGGCA-3′	5′-TCACTGTTGTGCAACTTGAA-3′	٥٦
٨٤	PT30169	5′-CCAGGAGAGATTGTGAGAA-3′	5′-AGTTGGATCCTCATCAGAA-3′	٦٠
٨٥	PT30394	5′-TCATGGTGGAATCAATGAA-3′	5′-GGCTTGTGTTCGCCTACAT-3′	٥٦
٨٦	PT30215	5′-GCAGACTGGTAGATCCGAC-3′	5′-TGGTCAGAGTTGTTCCTGC-3′	٦٠
٨٧	PT30395	5′-CGATCTCATATCTTATAAGT-3′	5′-GCGAAGGTAGAAGCCAAT-3′	٦٠
٨٨	PT1305	5′-GGTTGCATACCGCAATGAG-3′	5′-CGGCATGCAACTAATCCAT-3′	٥٦
٨٩	PT30171	5′-CCCATGCATGCCTAATTCT-3′	5′-CCCAGAAGCCTTATACAAC-3′	٦٠
٩٠	PT40049	5′-TTCCATGAACCTAGCCGT-3′	5′-TTCCATGAACCCTAGCCGT-3′	٦٠
٩١	PT30027	5′-CCGAGAGTTGCATTGATT-3′	5′-AGGTTCTACGCAAGAGATG-3′	٦٠
٩٢	PT1089	5′-CAGCAACCACGGATGTAG-3′	5′-CAAAGCTCCAGCAAGCATC-3′	٥٩
٩٣	PT20357	5′-GCAATGCGCAAACAC-3′	5′-CGAATCACATTTACA-3′	٦٠
٩٤	PT30005	5′-TTTCACAGGCTTAAG-3′	5′-CCCTGAGACTCAGATTC-3′	٥٢
٩٥	PT1106	5′-GTTTAACTGAACTTAG-3′	5′-CTTAAAGCGTTACGCTCT-3′	٥٦
٩٦	PT40080	5′-AAAGCGCTTAGGATAG-3′	5′-CCAATGCGCAATGGAAT-3′	٥٢
٩٧	PT1355	5′-CCCAATGCGCATAACG-3′	5′-GGCACATGTCTCAAGCA-3′	٦٠
٩٨	PT30469	5′-GGTTCAGTGTCCATAA-3′	5′-CCAGTGTCAGAAATTCGC-3′	٥٦
٩٩	PT20130	5′-AAATCGCGCTTAG-3′	5′-CCTGAAAAGCTGTC-3′	٥٢
١٠٠	PT1405	5′-ATATATCTCTGCGGA-3′	5′-GGGCTCTATTCACAGG-3′	٦٠

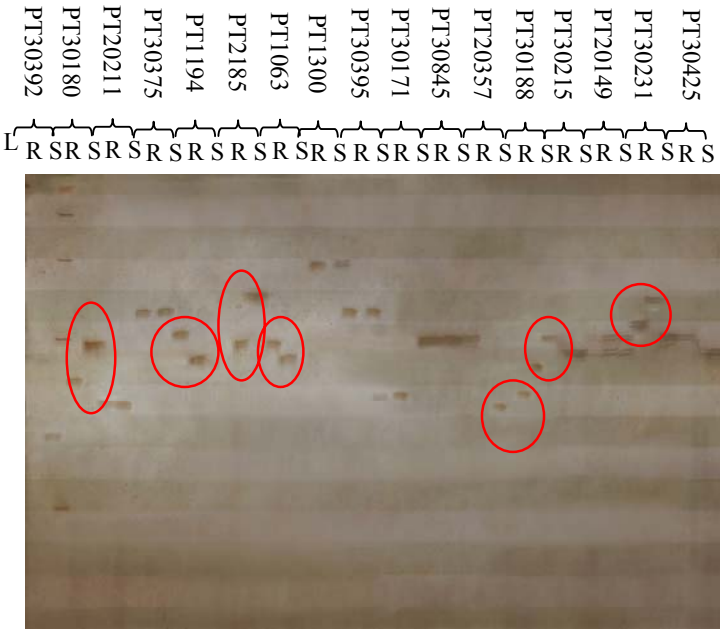
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

جدول۲- فهرست و مشخصات نشانگرهایی که دارای بیشترین چندشکلی در DNA ی والدین بودند :

نشانگر	وزن نشانگر (bp)		تعداد آلل ها
	حساس	مقاوم	
PT1193	۲۰۰	۱۱۰-۱۱۱	۳
PT20021	۲۱۰	۱۸۰	۲
PT20165	۱۳۰	۱۵۰	۲
PT20172	۲۴۵	۲۰۵	۲
PT20275	۱۸۰	۲۴۰	۲
PT30067	۱۱۰-۱۱۱	۱۳۰-۱۳۱	۴
PT30338	۲۷۰	۲۰۰	۴
PT20445	۱۸۰	۱۴۰	۲
PT30005	۲۸۰	۲۰۵	۲
PT30002	۳۰۰	۲۵۰	۲
PT30021	۱۲۰	۱۶۰	۲
PT20357	۱۷۰	۱۰۵ –۱۰۶	۳
PT30087	۲۹۰	۲۱۰	۲
PT30144	۲۲۰	۱۸۰	۲
PT30150	۱۷۰	۱۱۰–۱۱۱	۳
PT30188	۲۰۰–۲۰۱	۱۲۰	۳
PT30231	۱۵۵	۱۱۵	۲
PT30255	۱۵۰	۱۰۰	۲
PT30274	۳۰۰–۳۰۱	۲۱۰–۲۱۱	۴
PT30378	۱۶۰	۱۲۰	۲
PT30392	۲۲۰	۱۶۰	۲
PT30463	۲۶۰–۲۶۱	۲۰۰–۲۰۱	۴
PT30480	۱۷۰	۱۱۰	۲
PT30307	۱۵۰	۱۰۰	۲
PT40009	۲۱۰	۱۲۰	۲
PT30259	۲۳۰	۱۸۰	۲
PT1194	۲۸۰	۲۰۰	۲
PT2185	۱۲۰	۱۴۰	۲

جدول۳- اسامی و مشخصات نشانگرهایی که دارای چندشکلی مناسب بر روی بالک های مقاوم و حساس به بیماری PVY بودند

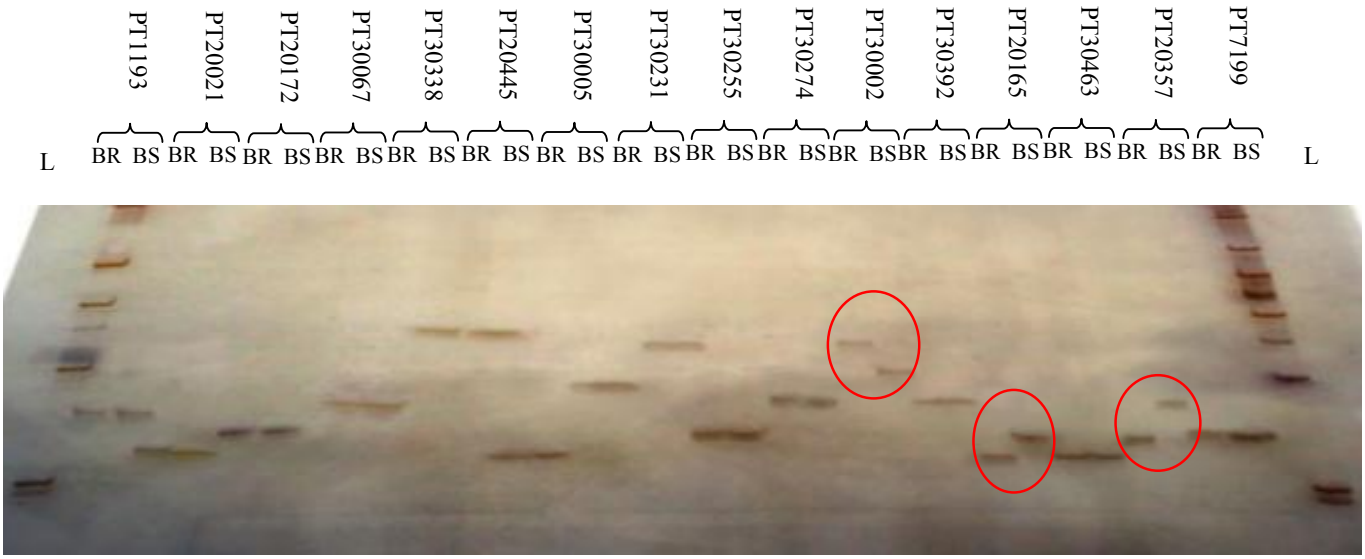
نشانگر	وزن نشانگر (bp)		تعداد آلل‌ها
	حساس	مقاوم	
PT20357	۱۷۰	۱۰۱–۱۰۶	۳
PT20165	۱۳۰	۱۵۰	۲
PT30002	۳۰۰	۲۵۰	۲



شکل۳ - الگوی چندشکلی نشانگرهای SSR مورد استفاده بر روی والد مقاوم (رقم VAM) و والد حساس (رقم K326) به بیماری PVY را نشان می دهد. R مربوط به والد مقاوم به بیماری PVY بوده و S مربوط به والد حساس به PVY می باشدو L مربوط به Ladder (نشانگر ۰۲۴۳) می باشد. مارکرهای دارای چند شکلی در شکل با دایره مشخص شده اند.

نشانگرهای مولکولی ابزار ارزشمندی برای به نژادی گیاهان و به ویژه شناسایی ژرم پلاسم و انتخاب غیر مستقیم ژنها هستند.امروزه ردیابی صفات مطلوب و گزینش به کمک نشانگرهای مولکولی یا (MAS) از طریق پیوستگی (لینکاژ) آنها با صفات مهم زراعی (کمی و کیفی) امکان پذیر شده است (et al. Bindler 2007). با دانستن جایگاه یک ژن بر روی کروموزوم،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]



شکل ۴- الگوی نوار بندی متفاوت نشانگرهای دارای بیشترین چندشکلی بر روی بالک های مقاوم و حساس به PVY. BR:) بالک مقاوم وBS :) بالک حساس. نشانگرهای دارای چندشکلی با دایره مشخص شده‌اند.

می توان از نشانگرهای مجاور آن برای تایید وجود صفت در نسل های تحت گزینش استفاده کرد. این موضوع، امکان گزینش سریع و دقیق ژنوتیپ های مطلوب را در مراحل اولیه رشد فراهم کرده و طول دوره به نژادی را کوتاه می نماید(Babiker et al. 2009). انتخاب به کمک نشانگر(MAS) برای مقاومت به آفات و بیماری ها و صفات مرتبط با کیفیت برخی گیاهان زراعی به عنوان بارزترین مثال به کارگیری معمول MAS در طرح های به نژادی مطرح است.با این حال کاربرد های عملی نشانگرهای مولکولی مشخص کرده است که موفقیت در MAS به عواملی از جمله اساس ژنتیکی صفت مورد نظر، تعداد افراد (بوته های) مورد تجزیه و تحلیل و زمینه ژنتیکی که ژن هدف به آن انتقال خواهد یافت، بستگی دارد (Korinsak et al. 2009). روش MAS اجازه انتخاب ژن هایی که صفات کمی و مقاومت گیاهان به آفات و بیماری ها را کنترل می کنند، فراهم می کند. اگرچه روش های مرسوم(سنتی) برای ارزیابی مقاومت به آفات و بیماری ها نتوانسته اند نتایج خوبی ارائه دهند، ولی اغلب به هزینه و زمان زیادی نیاز دارند (Rossi et al. (2000. Yang et al. 2009)، با استفاده از روش MAS ، نشانگرهای ریزماهواره(SSR) پیوسته به ژن مقاومت به بیماری بلاست برنج (ژن *Xa33*) را در کولتیوار Ba 7 برنج شناسایی کردند. نتایج آنالیز نهایی آنها نشان داد که نشانگر RM5509 به شدت به ژن مقاومت به بیماری بلاست برنج پیوستگی دارد، همچنین مشخص شد که یک ژن جدید غالب به نام ژن *Xa33(t)* مقاومت به بیماری بلاست را در کولتیوار Ba7 برنج ایجاد می کند (2009) .Yang et al. Shi et al. (2011) ، با استفاده از روش MAS ، از تعدادی نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR برای شناسایی ژن مقاومت به ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (TSWV)، ژن *SW-5* استفاده کردند. در این تحقیق، یک نشانگر SNP اختصاصی برای ژن مقاومت به بیماری TSWV (ژن *SW5-b*)در ژرم پلاسم های مختلف گوجه فرنگی شناسایی شد(Shi et al. 2011).(Ying et al. (2006، با استفاده از روش MAS به بررسی و شناسایی نشانگرهای مولکولی برای مقاومت به بیماری زنگ برگ در گندم پرداختند.این نشانگرهای شناسایی شده می توانند برای اصلاح و بهبود مقاومت به این بیماری در برنامه های اصلاحی گندم از طریق روش MAS استفاده شوند (Ying et al. 2007). در پژوهشی، مکان یابی مولکولی ژن مقاومت به بیماری PVY (ژن*Rysto*) در سیب زمینی بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن *Rysto* یک ژن غالب است که مقاومت به بیماری PVY را در سیب زمینی ایجاد می کند(Brigenti et al. 1998). در تحقیقی که Rodal and Xiong (2008) انجام دادند، بیان کردند که توتون رقم VAM و رقم NC745 حامل ژن *Va* هستند که این ژن باعث ایجاد مقاومت توتون VAM نسبت به بیماری PVY می

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

شود، ولی در تحقیق کنونی، مشخص شد که فقط توتون رقم VAM دارای مقاومت کامل به بیماری PVY بوده و این مقاومت توسط دو ژن به نام های *Va* و*Va2* کنترل می شود. از آنجایی که هنوز با استفاده از روش انتخاب به کمک نشانگر (MAS)، نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون، در داخل و خارج از کشور شناسایی نشده اند، در این پژوهش این کار با استفاده از نشانگر های SSR انجام گردید. در این پژوهش در آنالیز نهایی، ۳ نشانگر SSR پیوسته به ژن مقاومت به بیماریPVY در توتون شناسایی شدند.این ۳ نشانگر SSR به نام های PT20165 بر روی کروموزوم ۷ توتون ، PT20357 بر روی کروموزوم ۱۲ توتون و PT30002 بر روی کروموزوم ۳ توتون قرار دارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از نظر مالی توسط مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش حمایت شد. از راهنمایی های علمی خانم دکتر سپیده ترابی و آقای مهندس محمدرضا صلواتی میبدی که در کلیه مراحل اجرای عملی این تحقیق مرا بسیار راهنمایی کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

Ahifar H (1998) Tobacco Botany. Publication of Tobacco products Company of Iran. 3:15-23. (In Farsi)

Babiker E, Yen Y, Stein J (2009) Identification of a Microsatellite marker associated with Stem rust resistance gene Sr35 in wheat. Australian Journal of crop science 34: 1835-1850

Bindler G, Gunduz I, Plieske J, Ganal M, Rossi L, Gadani F, Donini P (2007) A Microsatellite marker based Linkage map of tobacco. Theorical and applied Genetic Journal 114: 341-349

Bindler G, Plieske J, Bakaher N, Gunduz I, Ivanov N, Donini P (2011) A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*)obtained from Large scale microsatellite marker development.Theorical and applied Genetic Journal 103: 157-185

Brigneti G, Garcia J, Baulcombe DC (1998) Molecular mapping of the Potato Virus Y resistance gene (Ry sto) in potato.Tag Theorical and applied Genetics 5:198-203

Cernak I, Taller J, Wolf I, Feher E, Babinszky G, Polgar Z (2008) Analysis of the applicability of Molecular Markers Linked to PVY extreme resistance gene Ry sto,and the identification of new markers. Acta Biological Journal 10:195-203

Czubacka A, Doroszewska T (2009) Obtaining tobacco double haploids containing different sources of resistance to PVY. Institute of Soil Science and plant cultivation.plant Breeding 121: 120-147

Davalieva K, Maleva I, Filiposki K, Spiroski O, Efremov G (2010) Genetic variability of Macedonian Tobacco vatieties determined by microsatellite marker analysis.diversity Journal 2: 439-449

Fuentes JL, Correa-Victoria F, Prado F, Aricapa G, Duque G (2000) Simple Sequance Repeat (SSR) markers Linked to the blast resistance gene (pi-1)in rice for Marker-assisted Selection(MAS). diversity Journal 13: 130-138

Gupton CL, Burk LG (1973) Location of the factor for resistance to potato virus Y in tobacco. The Journal of Heredity 26: 289-290

Heldak J, Bezo M, Stefunova V, Gailikova A (2007) Selection of DNA markers for detection of extreme resistance to Potato Virus Y(PVY) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum L.*) F1 progenies. Plant Breeding 43:125-134

Hu X, Meacham T, Ewing L (2009) A novel recombinant Strain of Potato Virus Y suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco.Virus Research 45(9): 68-76

Khajepoor MR (2004) Industrial plants. Publication of Isfahan Industrial university. (In Farsi)

Keiichi T, Akira U (2004) Anew Strain of Potato Virus Y isolated from burly tobacco in Japan. Diversity 21: 110-115

Korinsak S, Sriprakhon S, Sirithanya P, Jairina J, Vanarichit A (2009) Identification of Microsatellite Markers (SSR) Linked to a new bacterial blight resistance gene Xa33(t) in a rice cultivar (Ba 7). Genetic research 13:112-121

Li Y, Chen L, Lin F, Hassain K (2010) Identification of SSR markers Linked to resistance against the spotted stem Borer in Sorghum. Middle-East Journal of scientific research 6(5): 505-521

Mahtabi R (1999) Tobacco diseases. Publication of Tobacco products Company of Iran 2: 50-62. (In Farsi)

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of Molecular Markers Linked to disease–resistance genes by Bulk Segregated Analysis. Journal of Genetics 32: 982-990

Moon HS, Nifong JM, Nicholson JS, Heineman A, Lion K, Lewis RS (2009) Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) Genetic resources.Crop Science 49: 2149-2159

Najafi A, Mohammadi A, Torchi M, Moghaddam M (2009) Identification of Microsatellite markers Linked to resistance genes to Spike Fusarium disease in wheat, Agriculture knowledge magazine 12: 31-56. (In Farsi)

Naghavi MR, Ghareyazi B, Hosseyni Salekdeh GH (2005) Molecular markers. Publication of Tehran university 23(2):21-40. (In Farsi)

Piteekan T, Nantharat M, Denduangboripant J (2010) Genetic Plymorphism between tobacco cultivation-groups

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]

revealed by AFLP marker analysis. Journal of Agricultural Science 5:110-118

Reynolds RJ (2011) The symptoms of Potato Virus Y(PVY) in Burly tobacco, Phytopathology 103:81-84

Rodol A, Xiong Zh (2008) Complementary functions of two R-genes determine resistance durability of tobacco Virgin A mutant(VAM) to Potato Virus Y. Virology 379: 275-290

Rossi L, Bindler G, Pijneb H, Gadani F (2000) Evaluation of Molecular marker thecnologies for tobacco Variety identification. Plant and Animal Genome VIII Conference 11: 51-55

Sabir J (2010) RAPD and Protein Markers for resistance to PVY in Potato Cultivars. Journal of American Science 6(9): 30-42

Shi A, Vierling R, Grazzini R (2011) Identification of Molecular markers for SW-5 gene of tomato spotted wilt virus resistance. American Journal Biotechnology and Molecular Sciences 12: 120-127

Shou HD, Locas JB (1991) Tobacco disease. Center of universal publication of Tehran 9: 143-155. (In Farsi)

Tian YP, Liu JL, Zhang CL, Liu Y (2011) Genetic diversity of Potato Virus Y infecting tobacco Crops in china. Phytopathology 90: 2011-2019

Ying C, Wei S, Chao-Jie X, Xiu-Ling N (2006) Microsatellite Markers for A Yellow rust resistant gene in Wheat Cultivar guinong 21. Plant Physiology 110: 1857-1872

Yao ZH, Zhen Liu X, Sheng CH (2008) Genetic diversity among Flue-Cured tobacco Cultivars based on RAPD and AFLP Markers. An international Biology Journal 36: 1087-1101

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.12.1]