ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٥٥٦-٥٤٩

# معرفی یک نشانگر SCAR پیوسته به ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند

# To develop a SCAR marker linked to rhizomania resistance gene in sugar beet

پیمان نوروزی[1]

١- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

**Norouzi P*[1]**

1. Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: norouzi@sbsi.ir

(تاریخ دریافت:٩٤/١/٣١- تاریخ پذیرش:٩٤/٧/١٩)

## چکیده

**ریزومانیا مهمترین بیماری چغندرقند در ایران و برخی از مناطق جهان است که می‌تواند نقش مهمی در کاهش عملکرد شکر داشته باشد. بهترین راهکار مقابله با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. ردیابی ژن‌های مقاومت با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی ضروری است. هدف از تحقیق حاضر، همسانه‌سازی یک نشانگر RAPD پیوسته با ژن $Rz_1$ مقاومت به ریزومانیا و تبدیل آن به نشانگر اختصاصی SCAR بود. برای این کار، ابتدا DNA نمونه‌های گیاهی استخراج و سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگر مربوط به نشانگر RAPD موردنظر انجام شد. سپس قطعه مربوط به نشانگر جداسازی، خالص‌سازی و در ناقل پلاسمیدی همسانه‌سازی شد. سپس کلونی-های نوترکیب انتخاب و توالی‌یابی شدند. آغازگرهای اختصاصی از قطعات توالی‌یابی شده طراحی شدند. با آزمون آغازگرهای اختصاصی در واکنش PCR، تک باند اختصاصی برای نشانگر پیوسته به ژن $Rz_1$ بدست آمد. این نشانگر SCAR به‌نام ZN1 نامگذاری شد و از اختصاصیت و تکرارپذیری بیشتری نسبت به نشانگر RAPD اولیه خود برخوردار بود. چندشکلی این نشانگر در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند نیز تایید شد. بدین ترتیب از نشانگر SCAR حاصل از این تحقیق می‌توان در برنامه‌های اصلاحی گزینش به کمک نشانگر برای انتخاب بوته‌های مقاوم به ریزومانیا در چغندرقند بهره‌برداری کرد.**

**واژه‌های کلیدی**

**چغندرقند**
**ریزومانیا**
**مقاومت**
**نشانگر SCAR**
**نشانگر RAPD**

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]

## مقدمه

چغندرقند یکی از دو محصول مهم تامین‌کننده قند در جهان می‌باشد و سالانه بیش از ۳٤ میلیون تن از تولید شکر جهانی (حدود ۳۰ درصد) را به‌خود اختصاص داده‌است (Mekki 2014). میزان تولید شکر چغندرقند در داخل کشور حدود ششصد هزار تن در سال زراعی قبل بوده‌است (Anonymous 2014).

مهمترین بیماری که زراعت چغندرقند را تهدید می‌کند ریزومانیا[1] می‌باشد که زراعت این گیاه را مختل کرده‌است. این بیماری می‌تواند حتی تا صددرصد محصول را از بین ببرد. بیماری ریزومانیا اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۵ از فارس گزارش شد. متعاقب آن بیماری از اکثر مناطق چغندرکاری کشور گزارش شد (Toodehfallah 2000).

ویروس عامل ریزومانیا یا BNYVV[2] (Tamada 1975) توسط شبه قارچی به‌نام پلی میکسا بتا[3] منتقل می‌شود(Keskin 1964).

تنها راه حفاظت محصول چغندر قند در مزرعه آلوده به BNYVV، کشت ارقام مقاوم است. عمدتا دو ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندر قند شناسایی شده که از منابع مختلف منشا گرفته‌اند و به‌صورت $Rz_1$ و $Rz_2$ نامگذاری شده‌اند ( Mc Grann et al. 2009). البته تاکنون گزارشی در مورد توالی این ژن‌ها در منابع مشاهده نشده است که بتوان از آنها مستقیما به عنوان نشانگر مولکولی استفاده کرد.

با توجه به آنکه روش‌های ارزیابی کلاسیک گزینش مقاومت به بیماری از نوع فنوتیپی بوده و وابسته به شرایط محیطی و یکنواختی عامل آلوده‌کننده هستند و در فصل خاصی از سال انجام می‌گیرند و نیز بعضی گیاهان از عامل آلوده‌کننده به نحوی می‌گریزند و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی، به عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می‌توان گیاهان دربردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی کرد. بنابراین نشانگرهای مولکولی DNA می‌توانند ابزاری مفید برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم باشند و باعث صرفه‌جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب شوند (Norouzi 2007).

در ارتباط با ژن‌های مقاومت به بیماری ریزومانیا تحقیقات زیادی انجام گرفته است. از روش BSA[4] برای شناسایی نشانگرهای RAPD[5] پیوسته به ژن مقاومت به ریزومانیا در منبع Holly استفاده شده‌است (Pelsey and Merdinoglu 1996). آنها از ۱٦۰ آغازگر استفاده شده، ۱۹ آغازگر در مجموع ٤٤ نشانگر چندشکل تولید کردند که در ۹ گروه پیوسته طبقه‌بندی شدند. نام $Rz_1$ برای ژن Holly و نام $Rz_2$ برای ژن (های) WB42 پیشنهاد شده است (Scholten et al. 1997, 1999). ژن‌های مقاومت به ریزومانیا در منابع Holly و WB42 غیرآللی و به صورت پیوسته می‌باشند و با بررسی وراثت مقاومت به بیماری ریزومانیای چغندرقند مشخص شد که مقاومت در منبع WB42 با یک ژن غالب ($Rz_2$) کنترل می‌شود و فاصله آن از ژن $Rz_1$ در منبع Holly حدود ۳۵ سانتی مورگان می‌باشد (Amiri et al. 2003).

محققین با استفاده از چهار آنالوگ ژن مقاومت از چغندرقند به نام‌های (*cZR-1*، *cZR-9*، *cZR-7* و*cZR-3*) مشخص کرده‌اند که این آنالوگ‌ها بر روی کروموزوم ۳ قرار داشته و همراه با جایگاه ژن بزرگ اثر مقاومت به ریزومانیا تفکیک می‌شوند ( Lein et al. 2007). همچنین با استفاده از روشی مشابه و با استفاده از نشانگر RAPD، دو نشانگر به نام‌های OF-09 با اندازه ۱۱۵۰ جفت باز در وضعیت جفت و فاصله ۲۷ سانتی مورگان از ژن $Rz_1$ و دیگری OP-AN9 با اندازه ٦۰۰ جفت باز در وضعیت ناجفت و با فاصله ۱۳/۷ سانتی مورگان از ژن $Rz_1$ شناسایی شده‌اند ( Nouhi et al. 2008). با استفاده از تکنیک RAPD در جمعیت F2 حاصل از تلاقی رگه‌های نر عقیم ۲٦۱ و چغندر یک ساله با منابع مقاومت Holly و WB42 یک نشانگر ناجفت با پیوستگی شدید ( موسوم به AM2 با فاصله ۳/٦ سانتی مورگان) برای مکان ژنی $Rz_2$ حاصل از منبع WB42 و یک نشانگر جفت با پیوستگی کم برای مکان ژنی $Rz_1$ حاصل از منبع Holly به دست آمده است ( Amiri et al. 2009). همچنین با این تکنیک نشانگرهای R1 و R2 به ترتیب در فواصل ۲/۳۲ و۸/۳ سانتی مورگان از ژن $Rz_1$ در فاز ناجفت و نشانگرهای C4 و C1 به ترتیب در فواصل ۲۱/٤ و ۲۷/۵ سانتی مورگان از ژن $Rz_1$ در فاز جفت شناسایی شده‌اند ( Norouzi and

[1] Rhizomania
[2] *Beet necrotic yellow vein virus*
[3] *Polymyxa betae* keskin

[4] Bulk segegant analysis
[5] Random amplified polymorphism DNA



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]

Feghhi 2009). البته نشانگرهای مذکور در سایر جمعیت‌های اصلاحی و ارقام تجارتی تایید نشده‌اند (نوروزی، نتایج منتشر-نشده). Norouzi (2011) یک نشانگر RAPD جفت پیوسته به ژن $Rz_1$ (موسوم به PN11) شناسایی کرد که حضور آن در هیبریدهای جدید معرفی شده در موسسه تحقیقات چغندرقند اثبات شد. همچنین تکرارپذیری این نشانگر در اکثر ژنوتیپ‌های مقاوم به ریزومانیا با منبع مقاومت Holly تایید شده‌است. Stevanato et al. (2012) با استفاده از روش BSA در یک جمعیت F2 موفق به شناسایی چند نشانگر مولکولی SNP پیوسته به ژن مقاومت به ریزومانیا شدند. البته توالی این نشانگرها را گزارش نکرده‌اند. نشانگرهای SNP از نوع هم بارز بوده و قادر به تفکیک سه نوع ژنوتیپ حساس، هتروزیگوت مقاوم و هموزیگوت مقاوم به ریزومانیا از یکدیگر می‌باشند.

عمده تحقیقات مولکولی چغندرقند در جهان در شرکت‌های خصوصی تولید بذر صورت می‌گیرد و اطلاعات این نشانگرها در مالکیت معنوی آن شرکت‌ها می‌باشد، لذا مقالات و منابع جدید در این زمینه زیاد نبوده و در دسترس عموم محققان قرار ندارد که بتوان به آنها استناد داده و یا از آنها بهره‌برداری کرد.

هدف از تحقیق حاضر، همسانه‌سازی نشانگر رپید PN11 پیوسته با ژن $Rz_1$ مقاومت به ریزومانیا و تبدیل آن به نشانگر اسکار (SCAR[1]) جهت استفاده در گزینش به‌کمک نشانگر (MAS[2]) برای ارزیابی مقاومت به ریزومانیا در لاین‌ها و توده‌های اصلاحی چغندرقند می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ژنوتیپ‌های گوناگون چغندرقند حامل ژن $Rz_1$ از منابع مقاوم به ریزومانیا بودند که برای آزمون مولکولی نشانگر از آنها استفاده شد. فهرست برخی از این ژنوتیپ‌ها به همراه درصد حضور نشانگر اسکار شده ZN1 در جدول ۱ مشخص شده‌است.

استخراج DNA

استخراج DNA با روش Dellaporta et al. (1983) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز مشخص شد.

آزمون مولکولی RAPD–PCR

واکنش زنجیره پلی‌مراز برای انجام RAPD در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش انجام گرفت. حجم مورد نیاز DNA در یک واکنش، ۱/۵ میکرولیتر با غلظت ng/µl ۲۵، ۲/۵ میکرولیتر 10X buffer، دو میکرولیتر dNTP ۲/۵ میلی‌مولار، ۱/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، یک میکرولیتر آغازگر PN11 با غلظت ۵ میکرومولار، ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی‌مراز از شرکت سیناکلون بود. واکنش زنجیره پلی-مراز در دستگاه ترموسایکلر با مراحل زیر شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در $94^{\circ}C$، ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$، اتصال آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه در دمای $34^{\circ}C$، توسعه آغازگر به مدت ۸۰ ثانیه در دمای $72^{\circ}C$ و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای $72^{\circ}C$ برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش صورت گرفت. سپس الکتروفورز محصولات واکنش RAPD در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰، رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری در دستگاه مستندساز ژل انجام گرفت. در نهایت الگوی نواربندی نشانگر روی ژل مشخص شد.

تعیین توالی محصول RAPD و طراحی آغازگر اختصاصی

پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر در واکنش RAPD، خالص‌سازی محصول تکثیر شده توسط کیت [Vivantis-GF-1,AMBICLEAN KIT(PCR& Gel) USER GUIDE Version 1.2] انجام شد. قطعه مورد نظر در پلاسمید pTG19 – T همسانه-سازی شده وسپس با استفاده از روش Sambrook and Russell (2001) به *E. coli* انتقال یافت. انتخاب کلون‌های حاوی قطعه مورد نظر توسط Colony-PCR با آغازگرهای M13 با توالی رفت′5-AGGGTTTTCCCAGTCACGA-3 و توالی برگشت ′5-GAGCGGATAACAATTTCACA-3 و همچنین به کمک آغازگر RAPD انجام گرفت. استخراج پلاسمید بر مبنای لیز قلیایی باکتری‌ها به روش (Sambrook and Russell 2001) انجام پذیرفت. به منظور تعیین توالی، قطعه همسانه‌سازی شده به

[1] Sequenced characterized amplified region
[2] Marker assisted selection



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]

شرکت بایونیر (Bioneer Korea) ارسال شد. تعیین توالی قطعه همسانه‌سازی شده با استفاده از آغازگرهای یونیورسال انجام شد. از توالی محصول رپید دریافت شده جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی با نرم‌افزار Oligo 5 استفاده شد.

بررسی اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده بر اساس قطعات به دست آمده در RAPD

به منظور بررسی اختصاصیت آغازگرها، ابتدا آغازگرهای طراحی شده (موسوم به ZN-1-F و ZN-1-R) بر اساس قطعه به دست آمده از آزمون RAPD در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفتند (توالی آغازگرهای اختصاصی جهت ثبت درمقاله نیامده). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای نشانگر SCAR بدست‌آمده موسوم به ZN1 به صورت زیر انجام گرفت. مخلوط واکنش PCR، شامل یک میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۴۰ng/µl، دو میکرولیتر 10X buffer، یک میکرولیتر ۲/۵ dNTP میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس با غلظت ۵ میکرومولار، ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی‌مراز از شرکت سیناکلون برای هر واکنش بود. شرایط PCR برای نشانگر ZN1 شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵°C، ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸°C، توسعه آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای ۷۲°C برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش بود. سپس الکتروفورز محصولات واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۱۰۰، رنگ‌آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری در دستگاه مستندساز ژل انجام گرفت. در نهایت الگوی نشانگر روی ژل مشخص شد.

تایید نشانگر SCAR در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند

به منظور بررسی تکرارپذیری و تایید نشانگر ZN1 به دست آمده از چندین ژنوتیپ چغندرقند شامل ارقام تجارتی و لاین‌های مقاوم و حساس به ریزومانیا حامل ژن $Rz_1$ و یا فاقد آن ژن بودند استفاده شد (جدول ۱). برای این کار تعدادی بوته از ژنوتیپ‌های مذکور به صورت جداگانه با جفت آغازگر اختصاصی مربوط به نشانگر ZN1 آزمون و میزان حضور این نشانگر در ژنوتیپ‌ها بررسی و مشخص شد.

## نتایج و بحث

آزمون مولکولی RAPD با نشانگر جفت PN11 (شکل۱) در تک بوته‌های ژنوتیپ‌های منتخب مطابق جدول ۱ نشان داد که این نشانگر در اکثر ژنوتیپ‌ها دارای چند شکلی مورد انتظار (با اندازه تقریبی ۱۳۵۰ جفت باز) بوده است. این نشانگر جفت با آلل مقاومت به ریزومانیا پیوستگی داشت. بنابراین در اکثر تک بوته های مقاوم ژنوتیپ $Rz_1Rz_1$ و یا $Rz_1rz_1$ مشاهده شد و در اکثر تک بوته‌های حساس ژنوتیپ $rz_1rz_1$ دیده نشد. البته به علت فاصله بین نشانگر مذکور با ژن $Rz_1$ و در نتیجه احتمال نوترکیبی، تعداد کمی از بوته‌های مقاوم فاقد باند نشانگر و تعداد کمی از بوته‌های حساس واجد باند نشانگر بودند. این احتمال نوترکیبی بین نشانگر و ژن هدف در واقع خطایی است که از هر نشانگر قابل انتظار است.

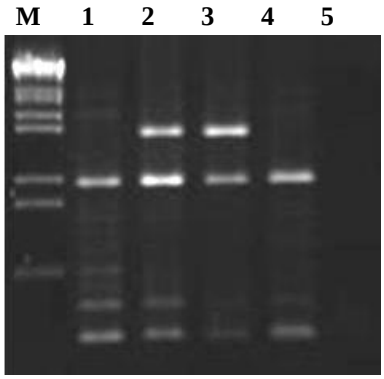
جدول۱- برخی از ژنوتیپ‌های چغندر حامل ژن *Rz1* به کار رفته در تحقیق

| ردیف | نام ژنوتیپ | نوع ژنوتیپ | درصد حضور نشانگر ZN1 |
|---|---|---|---|
| ۱ | Dorothea | رقم مقاوم | ۱۰۰ |
| ۲ | Flores | رقم مقاوم | ۱۰۰ |
| ۳ | Brejita | رقم مقاوم | ۹۲ |
| ٤ | Pauletta | رقم مقاوم | ۸۹ |
| ٥ | Jolgeh | رقم حساس | ۲ |
| ٦ | Rasoul | رقم حساس | ۰ |
| ۷ | SB-36 | لاین اوتایپ مقاوم | ۱۰۰ |
| ۸ | SBSI-005 | هیبرید متحمل | ٥٥ |
| ۹ | SBSI-006 | هیبرید متحمل | ۷۱ |
| ۱۰ | SBSI-007 | هیبرید متحمل | ٥٤ |
| ۱۱ | SBSI-016 | هیبرید متحمل | ٤٦ |
| ۱۲ | F-8714 | توده اصلاحی | ٦۲ |
| ۱۳ | F-8720 | توده اصلاحی | ۲٤ |
| ۱٤ | F-8726 | توده اصلاحی | ۷٤ |
| ۱٥ | F-8732 | توده اصلاحی | ۷۰ |
| ۱٦ | F-8734 | توده اصلاحی | ۳٥ |
| ۱۷ | F-8736 | توده اصلاحی | ۱۰ |
| ۱۸ | F-8738 | توده اصلاحی | ٥٥ |
| ۱۹ | F-8740 | توده اصلاحی | ٤۸ |
| ۲۰ | F-8769 | توده اصلاحی | ۲٤ |



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

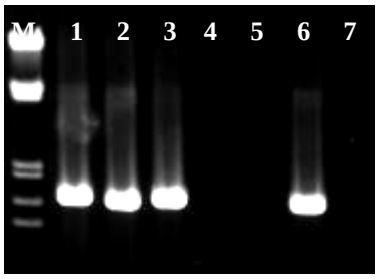
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]



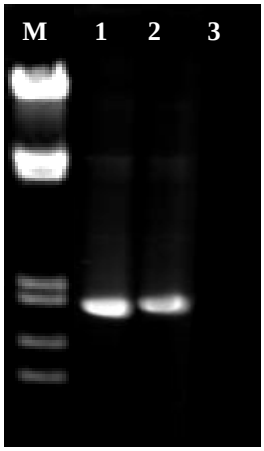

شکل۱- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر رپید PN11 در چند تک بوته از یک ژنوتیپ در حال تفکیک ژن *Rz*$_1$. M) نشانگر تعیین اندازه DNA (Lambda DNA/ *Eco*RI+ *Hin*dIII Marker)؛ چاهک‌های ۲ و ۳) محصول رپید دو تک بوته حامل نشانگر؛ چاهک‌های ۱ و ٤) محصول رپید دو تک بوته فاقد نشانگر؛ چاهک ٥) محصول Master Mix بدون DNA الگو.

پس از همسانه‌سازی قطعه نشانگر در ناقل پلاسمیدی ( TA Cloning Kit) pTG19 /T و انتقال به سلول‌های مستعد باکتری(DH5α) *E. coli* تعداد زیادی کلونی در محیط انتخابی LB (حاوی ٥٠ mg/l آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین) مشاهده شد. پس از انجام کلونی PCR با آغازگرهای M13 و نیز آغازگر RAPD مربوط به نشانگر، کلونی‌های مثبت که بیانگر وجود قطعه مورد نظر در آن‌ها بود انتخاب شدند و بر اساس شدت باند و عدم وجود باندهای اضافی، از کلونی‌های مورد نظر استخراج پلاسمید انجام شد. محصول کلونی PCR با جفت آغازگرهای M13 به صورت باند منفرد در اندازه مورد انتظار حدود ١٤٥٠ جفت باز برای نشانگر PN11 بر روی ژل آگارز ظاهر شد (شکل ۲). همچنین محصول کلونی PCR با آغازگر RAPD به صورت باند منفرد در اندازه مورد انتظار حدود ١٣٥٠ جفت باز برای نشانگر PN11 بر روی ژل آگارز ظاهر شد (شکل ۳). پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های نوترکیب، که بیانگر همسانه‌سازی موفق قطعه نشانگر RAPD مورد نظر در ناقل بودند برای توالی یابی ارسال شدند.

توالی‌یابی نشانگرهای RAPD و طراحی آغازگرهای اختصاصی توالی به دست آمده از نشانگر RAPD پیوسته با ژن *Rz*$_1$ ابتدا با استفاده از نرم‌افزار BLAST (NCBI) در بانک ژن با توالی‌های موجود هم‌ردیف و مقایسه شد. این توالی مربوط به بخشی از کروموزوم شماره ۳ چغندرقند بود. سایر محققان نیز نشانگرهای پیوسته با ژن‌های *Rz*$_1$ و *Rz*$_2$ را به این کروموزوم منتسب کرده بودند (Barzen et al. 1997; Lein et al. 2007; Amiri et al. 2009). پس از تایید توالی نشانگر با استفاده از برنامه الیگو پنج طراحی آغازگرهای اختصاصی با اندازه حداقل ۱۸ نوکلئوتید انجام گرفت و بدین ترتیب نشانگر RAPD به SCAR به نام ZN1 تبدیل شد. نتایج PCR با این نشانگر SCAR در شکل ٤ مشخص شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود باند اختصاصی مربوط به نشانگر با اندازه مورد انتظار ٥٠٠ جفت باز به دست آمده است.




شکل۲- نتیجه کلونی PCR با آغازگرهای M13 در شش کلونی برداشت شده جهت صحت همسانه‌سازی قطعه نشانگر رپید پیوسته با ژن *Rz*$_1$ در ناقل pTG19/T. M) نشانگر تعیین اندازه DNA ( Lambda DNA/ *Eco*RI+ *Hin*dIII Marker)؛ چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و ٦) کلونی‌های نوترکیب و حامل قطعه موردنظر؛ چاهک‌های ٤ و ٥) کلونی‌های فاقد قطعه موردنظر؛ چاهک ۷) محصول Master Mix بدون افزودن کلونی.



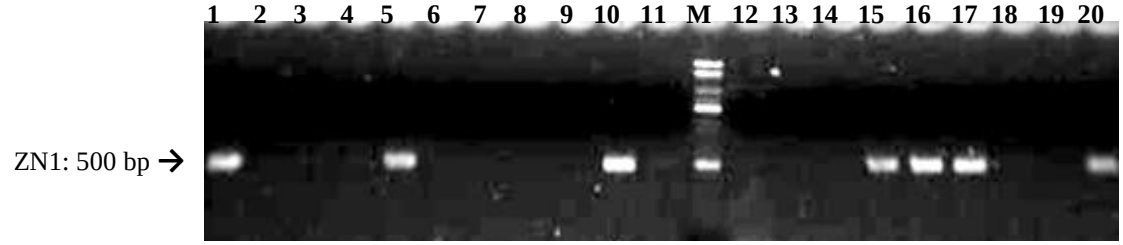

شکل۳- نتیجه کلونی PCR با آغازگرهای رپید در سه کلونی برداشت شده جهت صحت همسانه‌سازی قطعه نشانگر رپید پیوسته با ژن *Rz*$_1$ در ناقل pTG19/T. M) نشانگر تعیین اندازه DNA ( Lambda DNA/ *Eco*RI+ *Hin*dIII Marker)؛ چاهک‌های ۱ و ۲) کلونی‌های نوترکیب و حامل قطعه موردنظر؛ چاهک ۳) کلونی فاقد قطعه موردنظر.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]

جدول۲- مقایسه نتایج سه نشانگر مولکولی SCAR جفت پیوسته با ژن $Rz_1$ مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند

| ردیف | نام نشانگر | تعداد جمعیت آزمون شده | تعداد جمعیت شناسایی شده | درصد شناسایی جمعیت‌ها | درصد توافق نشانگر با نتایج مقاومت مزرعه‌ای | درصد حضور نشانگر در ارقام حساس | درصد حضور نشانگر در ارقام مقاوم |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | PN1 | 110 | 65 | 59 | 76 | 17 | 84 |
| ۲ | PN2 | 28 | 17 | 60 | 79 | 16 | 83 |
| ۳ | ZN1 | 57 | 54 | 95 | 90 | 2 | 92 |




شکل٤- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر جفت ZN1 در ۲۰ تک بوته (چاهک‌های شماره ۱ تا ۲۰) از توده اصلاحی F-8734. M) نشانگر تعیین اندازه DNA (Lambda DNA/ *Eco*RI+ *Hin*dIII Marker).

بر اساس قطعه ۵۰۰ جفت بازی اختصاصی نشانگر SCAR به دست آمده در واکنش PCR (شکل ٤)، ارقام و لاین‌های مقاوم و حساس به ریزومانیا تعیین خصوصیت شدند.

نتایج حضور این نشانگر در ژنوتیپ‌های مذکور در جدول ۱ خلاصه شده‌است. نتایج تحقیقات گذشته وجود یک ژن بزرگ اثر برای ایجاد مقاومت به ریزومانیا را تایید کرده‌است (Bazen et al. 1992, 1997; Scholten et al. 1996, 1997, 1999; Amiri et al. 2003). در تحقیقات قبلی نگارنده نشان داده شده که دو نشانگر مولکولی PN1 و PN2 که با ژن $Rz_1$ پیوستگی دارند در بیش از ۸۰ درصد بوته‌های ارقام تجارتی مقاوم دیده می‌شوند (Norouzi et al. 2011). Lein et al. (2007) چهار نشانگر مولکولی برای ژن مقاومت به ریزومانیا در دو جمعیت مختلف F2 شناسایی کردند. ولیکن این نشانگرها در ژنوتیپ‌ها و ژرم‌پلاسم های مختلف واجد ژن $Rz_1$ بررسی و تایید نشدند. Feghhi et al. (2012) تعدادی نشانگر پیوسته به ژن مقاومت به ریزومانیا معرفی کردند. این نشانگرها از نوع رپید با تکرارپذیری کمتر بوده و فقط در جمعیت مکان‌یابی F2 موردنظر ارتباط نزدیکی با ژن مقاومت نشان داده‌اند و در سایر جمعیت‌ها و ارقام چغندرقند بررسی نشده‌اند. Stevanato et al. (2012) سه نشانگر مولکولی SNP با پیوستگی زیاد به ژن مقاومت به ریزومانیا شناسایی کردند. البته اطلاعات مربوط به توالی نشانگرهای مذکور در دسترس نمی‌باشد تا بتوان تکرارپذیری آنها را در ژرم‌پلاسم موجود چغندرقند در کشور بررسی کرد. با این حال بر اساس آزمون‌های مولکولی SNP انجام شده بر روی ژنوتیپ‌های ارسال شده و مقایسه نتایج آنها با نتایج نشانگر توسعه‌یافته ZN1 (معرفی شده در تحقیق حاضر) به نظر می‌رسد نشانگر ZN1 با خطای کمتری گیاهان مقاوم را از حساس تفکیک می‌کند و خطای نوع اول نشانگر (بوته‌های حساس ولی دارای باند نشانگر) در ZN1 کمتر از SNP مذکور می‌باشد (نوروزی، نتایج منتشر نشده). همچنین Norouzi et al.(2013) از یک نشانگر ناجفت برای بررسی اثر دز ژن مقاومت به ریزومانیا استفاده کردند و نتیجه گرفتند که ژنوتیپ‌های هموزیگوت غالب نسبت به هتروزیگوت‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند.

مقایسه نتایج تایید دو نشانگر جفت SCAR پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا موسوم به PN1 و PN2 به دست آمده در تحقیق قبلی نگارنده (Norouzi et al. 2011) با نتایج حاصل از این تحقیق برای نشانگر جفت ZN1 مطابق جدول ۲ نشان داد که بر اساس درصد توافق نتایج نشانگرها با داده‌های مقاومت مزرعه‌ای مربوط به تک بوته‌ها در توده‌های اصلاحی و نیز درصد حضور نشانگرها در ارقام تجارتی حساس و مقاوم، نشانگر جفت ZN1 با نسبت توافق ۹۰ درصد با نتایج مقاومت مزرعه‌ای و نسبت حضور ۹۲ درصد در ارقام تجارتی مقاوم مناسب‌ترین نشانگر جفت به دست آمده می‌باشد.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]

**نتیجه‌گیری**

استفاده از ارقام مقاوم در کنترل هر بیماری یکی از ساده‌ترین و در عین حال مطمئن‌ترین روش مبارزه است. برای شناسایی گیاهان مقاوم به ریزومانیا در چغندرقند روش‌های فنوتیپی در مزرعه و روش‌های سرولوژیکی مانند الایزا و نیز روش‌های ژنوتیپی با استفاده از نشانگرهای مولکولی وجود دارد. با توجه به آنکه روش‌های ارزیابی کلاسیک گزینش مقاومت به بیماری از نوع فنوتیپی بوده و وابسته به شرایط محیطی و یکنواختی عامل آلوده-کننده هستند و در فصل خاصی از سال انجام می‌گیرند و نیز برخی از گیاهان از عامل آلوده‌کننده به نحوی می‌گریزند و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی، به عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می‌توان گیاهان در بر دارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی کرد. در این تحقیق یک نشانگر جفت RAPD پیوسته با ژن $Rz_1$ (Norouzi 2011) پس از طی مراحل همسانه‌سازی، توالی‌یابی و طراحی آغازگرهای اختصاصی تبدیل به یک نشانگر SCAR به نام ZN1 شد که از اختصاصیت و تکرارپذیری بیشتری نسبت به نشانگر RAPD اولیه خود و نیز سایر نشانگرهای تاکنون شناسایی شده در داخل کشور برخوردار بود. این نشانگر در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند نیز تایید شد. به طوری که در اکثر بوته‌های مقاوم باند نشانگر وجود دارد و در اکثر بوته‌های حساس باند نشانگر دیده نمی‌شود. بنابراین با ترکیب آغازگرهای یک نشانگر جفت (پیوسته با آلل مقاومت) به دست‌آمده در تحقیق حاضر و یک نشانگر ناجفت (پیوسته با آل حساسیت) در یک واکنش دوبلکس PCR می‌توان مانند یک نشانگر SNP اقدام به شناسایی هر یک از سه ژنوتیپ احتمالی برای جایگاه ژن مقاومت به ریزومانیا کرد و بوته‌های هموزیگوت مقاوم را در والدهای هیبرید تجارتی چغندرقند شناسایی و غربال کرد. بدین‌ترتیب از نشانگر ZN1 حاصل از این تحقیق می‌توان در برنامه‌های اصلاحی گزینش به کمک نشانگر با دقتی بالا برای انتخاب ژنوتیپی بوته-های مقاوم به بیماری ویروسی ریزومانیا در چغندرقند بهره‌برداری کرد.

**سپاسگزاری**

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

**منابع**

Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian SY, Ghannadha MR, Izadpanah K (2003) The inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42: Statistical comparisons with Holly-1-4. Euphytica 132: 363-373.

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

Anonymous (2014) Utilization Statistics of sugar factories of Iran. Available at http://www.sbsi.ir/sugar_facts. SBSI, Karaj, Iran (In Farsi).

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

Barzen E, Stahl R, Fuchs E, Borchardt DC, Salamini F (1997) Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet $Rz_1$allele conferring resistance to rhizomania. Molecular Breeding 3:231-238

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

Feghhi SMA, Norouzi P, Saidi A, Zamani K, Amiri R (2012) Research Article Identification of SCAR and RAPD markers linked to $Rz_1$ gene in Holly sugar beet using BSA and two genetic distance estimation methods. Electronic Journal of Plant Breeding 3: 598-605.

Izadpanah K, Hashemi P, Kamran R, Pakniat M, Sahanpour A, Masoomi M (1996) Occurance of beard-root disease (like rhizomania) in Fars province. Plant Pathology Journal 23: 200-206.

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.

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

Mc Grann GRD, Grimmer MK, Mutasa-Gttgens ES, Stevens M (2009) Progress towards the understanding and



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]

control of sugar beet rhizomania disease. Molecular Plant Pathology 10: 129-141.

Mekki BB (2014) Root yield and quality of sugar beet (Beta vulgaris L.) in response to foliar application with urea, zinc and manganes in newly reclaimed sandy soil. American-Eurasian Journal of Agriculture Environment Sciences 14: 800-806.

Norouzi P (2007) Screening of plants resistant to beet cyst nematode using molecular marker. In: Proceeding of second national molecular and cellular biology congress of Iran. International Science and high technology Center. Kerman. 516-518. (In Farsi).

Norouzi P, Feghhi SMA (2009) Identification of some RAPD molecular markers linked to rhizomania resistance gene in sugar beet. In: Proceeding of 6th National Biotechnology Congress of Iran. 112. (In Farsi).

Norouzi P, Mahmoudi SB, Aghaiezadeh M, Kakueinezhad M, Orazizadeh MR, Vahedi S, Fathi MR (2011) Repeatability of Some Molecular Markers Linked to Rhizomania Resistance Gene ($Rz_1$) in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Genotypes. Jornal of Crop Breeding 3: 30-42. (In Farsi).

Norouzi P (2011) Confirmation of selected molecular markers linked to rhizomania resistance gene from Holly source in sugar beet genotypes. Research final report. Research, Education and Extention Organization. Iran. Registration no: 90/528. 42p. (In Farsi).

Norouzi P, Rahmani D, Oroojalian S, Mahmoudi SB, Aghaiezadeh M, Kakueinezhad M, Orazizadeh MR, Vahedi S, Fathi MR (2013) Confirmation of repulsion molecular markers linked to rhizomania resistance gene ($Rz_1$) and evaluation of gene dose effect in sugar beet genotypes. Sugar Beet Journal 29: 129-144. (In Farsi).

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

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

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, Third Edition. Vol 1.

Scholten OE, Jansen RC, Paul Keizer LC, De Bock TSM, Lang W (1996) Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. Euphytica 91: 331-339.

Scholten OE, Klein-Lankhosrst RM, Esselink DG, De Bock TSM, Lange W (1997) Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta* accessions. Theoretical and Applied Genetics 94:123-130.

Scholten OE, De Bock TSM, Klein-Lankhorst RM, Lange W (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.

Scholten OE, Lange W (2000) Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica 112: 219-231.

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

Toodehfallah M, Arjomand N, Mahmoudi B (2000) Investigation of infestation and dispersion of rhizomania disease of sugar beet in Iran. In: Proceeding of 14th plant protection congress of Iran. Esfahan Technical University. Esfahan. 72. (In Farsi).

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.10.2 ]