دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی مولکولی و افزایش فراوانی ژن مقاومت به نماتد مولد سیست در طی چند نسل خود گرده‌افشانی چغندرقند

پیمان نوروزی[۱]

۱- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، (نویسنده مسئول: norouzi@sbsi.ir)

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۸

چکیده

به منظور افزایش فراوانی ژن مقاومت به نماتد مولد سیست چغندرقند از توده اصلاحی (20314*W-1009)*261 که حامل ژن $Hs1^{pro-1}$ بود استفاده شد. این توده در سال اول در برنامه سلکسیون قرار گرفت و بوته‌ها در مزرعه علامت گذاری و نمونه‌های برگی جهت استخراج DNA تهیه گردید و سپس ارزیابی مولکولی گیاهان حامل ژن مقاومت با استفاده از نشانگر مولکولی STS و آزمون PCR اختصاصی انجام گرفت. در سال دوم این تحقیق، ریشه‌های ورنالیزه شده حامل ژن مقاومت پس از یادداشت برداری وضعیت حضور علائم گال روی ریشه‌ها در زیر کیج جهت تهیه بذر S1 در مزرعه ایزوله کشت گردیدند. بذور برداشت شده S1 همزمان در گلخانه جهت آزمون مولکولی و در مزرعه اشتکلینگ جهت تهیه ریشه کشت و در طول فصل زمستان در داخل مزرعه ورنالیزه شدند. نتایج آزمون مولکولی گیاهان S1 با استفاده از نشانگر $Hs1^{pro-1}$ نشان داد که حضور ژن مقاومت در لاین‌های S1 بین ۲۵ تا ۶۳ درصد متغیر است. در سال سوم، مانند سال قبل، ریشه‌های حامل ژن مقاومت که در زمستان سال قبل ورنالیزه شده بودند در زیر کیج جهت تهیه بذر S1 جدید در مزرعه ایزوله کشت گردیدند. بذور برداشت شده S1 در گلخانه جهت آزمون مولکولی کشت شدند. نتایج آزمون مولکولی گیاهان S1 با استفاده از نشانگر $Hs1^{pro-1}$ نشان داد که حضور ژن مقاومت در لاین‌های S1 منتخب افزایش یافته است و بین ۳۹ تا ۸۰ درصد متغیر می‌باشد. بنابراین نتایج نشان داد که با چند نسل خودگرده افشانی لاین‌های حامل ژن مقاومت به همراه انتخاب ژنوتیپی گیاهان مقاوم با استفاده از نشانگر مولکولی می‌توان به لاین‌های با درصد بالای ژن مقاومت دست یافت.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، نماتد مولد سیست، مقاومت، گرده افشان، دیپلوئید، نشانگر مولکولی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

چغندرقند یکی از دو محصول مهم تـأمین کنندۀ قند در جهان مـی‌باشـد. سـطح کشـت جهـانی آن بـالغ بـر ۹ میلیـون هکتـار اسـت. چغندرقند در حال حاضر بیش از ۳۴ میلیـون تن از تولید شکر جهانی (۲۹ درصد) را به خود اختصاص داده است که تقریباً ۲۷ میلیون تـن آن در اروپـا، ۴/۵ میلیـون تـن در آمریکـای مرکزی و شـمالی، ۲/۵ میلیـون تـن در آسـیا، ۸۴۰ هزار تـن در آفریقـا و ۴۵۰ هـزار تـن در آمریکای جنـوبی تولیـد مـی‌شـود (۷). میـزان تولید ریشه چغندرقند در داخل کشـور حـدود چهار میلیون و ششصد هزار تن در سـال قبـل بوده است (۱).

خسارت نماتدها در کشاورزی حدود ۷۷ میلیارد دلار در سال در جهان است (۱۰) و کاهش عملکرد چغندرقند در اثر حمله نماتدها حدود ۱۰ درصد برآورد شده است (۲۴). نماتد سیستی یا مولد سیست چغندرقند[1] مهم‌ترین نماتد چغندرقند است و بیش از یکصد سال است که موضوع مطالعات گسترده‌ای می‌باشد. دامنه میزبانی وسیعی شامل گونه‌های زیادی از خانواده کنوپودیاسه و کروسیفره را دارا می‌باشد. در ایران مناطقی از استان‌های خراسان، اصفهان، فارس، آذربایجان غربی، کرمانشاه و کرمان، آلوده به این نماتد هستند (۲). نماتد سیستی، تقریباً در تمام مناطق چغندر کاری دنیا یافت می‌شود و بسته به شرایط اقلیمی بین ۵-۲ نسل در سال تولید می‌کند. علائم بیماری در مزرعه به‌صورت لکه‌های موضعی همراه با ضعف و زردی بوته‌ها در اواسط دوره رشد بروز می‌کند که پس از خارج کردن ریشه‌ها از خاک وجود ریشه‌های فرعی[2] زیاد و سیست‌های شیری رنگ نماتد روی ریشک‌های فرعی نمایان است. در گیاهان آلوده، ریشه اصلی کوتاه و ریشه‌های فرعی متعددی ایجاد می‌شود (۱۶). نماتدها را می‌توان به وسیله تناوب زراعی، ضد عفونی با سموم نماتد کش و یا کاشت ارقام مقاوم کنترل نمود. کنترل شیمیایی به علت خطر سموم و اثرات زیست محیطی با محدودیت مواجه است. بنابراین اصلاح واریته‌های مقاوم به عنوان امید بخش‌ترین راه کنترل پیشنهاد می‌شود (۱۱).

در ارتباط با استفاده از مقاومت ژنتیکی در مبارزه با نماتد، دونی و ویتنی (۶) در آمریکا و های‌بروک (۹) در هلند با ارزیابی ژرم پلاسم‌های چغندرقند و مواد اصلاحی آن معلوم نمودند که منبع مقاومت در گونه *Beta vulgaris sub.sp.vulgaris* وجود ندارد. درون گونه‌های وحشی چغندر حداقل سه ژن مقاومت به نماتد روی کروموزوم‌های مختلف بخش Procumbents قرار دارند که شامل ژن *Hs1* در کروموزوم شماره یک هر سه گونه Procumbents، ژن *Hs2* در کروموزوم شماره هفت گونه‌های *Beta procumbens* و *B. webbiana* و ژن *Hs3* در کروموزوم شماره هشت گونه *B. webbiana* می‌باشد (۱۱). پس از تلاقی بین گونه‌ای بین چغندرقند و چغندر وحشی *B.procumbens* و تولید چغندرهایی با یک کروموزوم اضافی[3] از گونه وحشی، منوسومیک‌های مقاوم به نماتد بدست آمد. ژن *Hs1* *با* منشا گونه *procumbens* موسوم به $Hs1^{pro-1}$ بوده که

1- *Heteroderaschachtii*schmidt 2- Hairy root 3- Monosomic addition lines

Archive of SID

www.SID.ir

بیش از سایر منابع جهت انتقال به ارقام زراعی چغندرقند بکار رفته است. این ژن مقاومتی تک ژنی و غالب را ایجاد می‌نماید (۱۱). این ژن مقاومت روی کروموزوم شماره یک *B.procumbens* قرار دارد و به ژن $Hs1^{prol}$ مشهور است که توسط کای و همکاران (۳) جداسازی و تعیین توالی گردید.

همچنین در گونه وحشی *Beta maritima* مقاومت به نماتد سیستی وجود دارد که وراثت آن چند ژنی و با ژن‌های مغلوب کنترل می‌شود. ژن‌های مقامت به نماتد سیستی چغندرقند از خزانه ژنی گونه‌های وحشی جنس *Beta* به درون لاین‌های اصلاحی وارد شده‌اند (۴).

با توجه به آنکه روش‌های 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 بعضی گیاهان از عامل آلوده کننده به نحوی می‌گریزند وبه ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی، به عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می‌توان گیاهان در بردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. بنابراین نشانگرهای مولکولی DNA می‌توانند ابزاری مفید برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم باشند و باعث صرفه‌جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب گردند (۱۸،۱۷،۸). مصباح و همکاران (۱۴) موفق به شناسایی سه قطعه توالی DNA تکراری به نام‌های OP-X2، PB6-4 و Sat-121 در ژنوم گونه‌های وحشی چغندر از گروه Procumbents شدند که با ژن(های) مقاومت به نماتد پیوستگی ژنتیکی داشتند.

لنگ و دی باک (۱۲) با مشاهدهٔ حضور Sat-121 در گیاهانی که یک قطعه و یا کل کروموزوم شمارهٔ یک از *B.patellaris* یا *B.procumbens* به آنها اضافه شده بود، نتیجه گرفتند توالی فوق می‌تواند به عنوان نشانگر محل ژنی ژن(های) $Hs1^{pro-1}$ و $Hs1^{pat-1}$ به کار برده شود. ساندل و همکاران (۲۰) در بین گیاهانی که ژن *Hs1* به آنها منتقل شده بود، گیاهان مقاومی یافتند که ژن *Hs1* را از دست داده بودند و همچنین نوار حدود ۱۵۹bp توالی تکراری Sat-121 نیز در این گیاهان مقاوم دیده نشد. آنها وجود حداقل یک ژن دیگر را برای ایجاد مقاومت در مقابل نماتد مولد سیست چغندرقند ضروری دانسته‌اند. واحدی و همکاران (۲۳) در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند گام‌های اولیه در جهت تعیین منابع مقاومت به نماتد مولد سیست چغندرقند برداشتند و طی دو سال آزمایش مزرعه‌ای نتیجه گرفتند که، تعدادی از توده‌های مورد آزمون که با ژنوتیپ W-1009 تلاقی یافته‌اند، از نظر کیفی و مقاومت برتری خوبی نسبت به والدین و شاهد خود بودند. سلطانی (۲۱) در آزمایشی مقاومت ۱۲ رقم از ارقام داخلی و خارجی را در دو منطقه خراسان و آذربایجان غربی با استفاده از شاخص تولید مثل (RF) نسبت به نماتد مولد سیست ارزیابی کرد. نتایج این آزمایش نشان داد که ارقام Paulina و Pauletta در هر دو منطقه نسبت به این نماتد مقاومت در خور توجهی داشتند و نسبت به سایر تیمارها برتری

Archive of SID

www.SID.ir

داشتند. در بین هیبریدهای داخلی هیبرید ۲۷۰۶۰ نسبت به سایر هیبریدها از نظر صفات مورد بررسی از وضعیت بهتری برخوردار بودند. برای شناسایی گیاهان مقاوم، روش‌های فنوتیپی (در گلخانه و مزرعه) و ژنوتیپی (در آزمایشگاه با استفاده از نشانگرهای مولکولی) وجود دارد. استفاده از نشانگر *Hs1* برای گزینش ژنوتیپ‌های چغندرقند مقاوم به نماتد در کشور برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ مطرح شد (۱۷). وجود همبستگی نشانگر مولکولی ژن *Hs1* با مقاومت به نماتد سیستی در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند توسط مصباح و همکاران (۱۵) نیز تائید گردید. نوروزی (۱۸) در طی مطالعه نشانگر ژن $Hs1^{pro-1}$ در تک بوته‌های مقاوم توده‌های اصلاحی حاصل از تلاقی رقم مقاوم با رقم حساس نشان داد که درصد حضور ژن مقاومت در بین توده‌ها از صفر تا ۶۰ درصد متغیر است و درمجموع توده‌ها ۳۴ درصد گیاهان مقاوم دارای ژن $Hs1^{pro-1}$ بوده‌اند و با توجه به این مشاهدات اینگونه نتیجه‌گیری نمود که در گیاهان مقاوم به نماتد یا ژن‌های مقاومت دیگری وجود داشته است که با آغازگر اختصاصی ژن $Hs1^{pro-1}$ قابل تکثیر نبوده و یا بوته‌های مقاوم در واقع حساس بوده و در ارزیابی گلخانه‌ای به طریقی از لاروهای نماتد گریز نموده‌اند. ایشان بیان داشت که با توجه به آنکه حضور این نشانگر مولکولی همواره مقاومت فنوتیپی گیاهان مورد آزمون را نشان داده است، می‌توان از این نشانگر در غربال ژنوتیپ‌های چغندرقند مقاوم به نماتد مولد سیست در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود و بدین ترتیب در پروسه‌های تهیه رقم، زمان اصلاحی را کاهش و دقت انتخاب تک بوته‌ها را از طریق ارزیابی ژنوتیپی با نشانگر افزایش داد. برای این منظور حداقل نیاز به یک والد مقاوم به نماتد است که در تهیه رقم تجارتی به کار رود. با انجام تحقیق حاضر به یک یا چند والد گرده افشان دیپلوئید مقاوم به نماتد دست خواهیم یافت که در تهیه بذر هیبرید تجارتی مقاوم قابل استفاده خواهند بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

توده اصلاحی چغندرقند (20314*W-1009)*261 که از تلاقی چغندر زراعی (*Beta vulgaris* L.) با لاین جابجائی W-1009 (با منشا *B. procumbens*) بدست آمده است، مواد گیاهی این تحقیق را تشکیل داد. بذر این توده در اوایل بهار در مزرعه سلکسیون کشت شد و مراقبت‌های مرحله داشت صورت گرفت.

نمونه‌برداری گیاهان از مزرعه

از حدود ۲۰۰ تک بوته شماره‌گذاری شده در مزرعه، نمونه برگ جداسازی و به آزمایشگاه منتقل و در فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری گردید.

استخراج DNA

پس از نمونه‌برداری برگ از گیاهان موردنظر، استخراج DNA با روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (۵) انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

آزمون PCR

پس از رقیق کردن DNA های استخراجی با آب مقطر، واکنش استاندارد PCR با ۷۵ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR، dNTP ۲۰۰ میکرو مولار، ۲۵ نانوگرم آغازگرهای اختصاصی ژن *Hs1*$^{pro-1}$ و یک واحد آنزیم تک پلیمراز[1] در حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر به شرح زیر صورت گرفت: ۵ دقیقه در $94^{o}C$ و ۳۵ چرخه شامل (یک دقیقه واسرشته سازی در $94^{o}C$، ۵۰ ثانیه اتصال آغازگر در $50^{o}C$ و ۸۰ ثانیه توسعه یا بسط آغازگر در $72^{o}C$) و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای بسط در $72^{o}C$ برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده، سپس الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۲ در صد انجام گرفت و ژل در محلول اتیدیوم بروماید یک میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد و نوارهای DNA توسط دستگاه مستند سازی ژل[2] تحت نور ماورای بنفش رؤیت گردیده و عکس برداری شد.

ورنالیزه کردن ریشه‌ها

پس از مشخص شدن نتایج مولکولی، ریشه گیاهان حامل ژن *Hs1* از مزرعه برداشت و به سردخانه موسسه جهت ورنالیزاسیون منتقل شدند.

تهیه بذر S1

ریشه‌های بوته‌های انتخاب شده حامل ژن مقاومت به نماتد که زمستان سال قبل ورنالیزه شده بودند ابتدا از نظر ظاهری و وضعیت گال روی ریشه یاد داشت برداری شدند. ریشه‌ها پس از دو نیم شدن و ضدعفونی با محلول قارچکش، به مزرعه منتقل و و در زیر کیج کشت شدند. مراقبت‌های مرحله داشت شامل آبیاری، کوددهی و وجین علف‌های هرز تا زمان گلدهی و تولید بذر S1 در مزرعه صورت گرفت.

کشت بذر S1 در گلخانه و آزمون مولکولی

از شماره بذرهای S1 که بذر به اندازه کافی تولید نموده بودند در گلدان‌های ۲۴ تائی در گلخانه کشت شدند و پس از یک ماه از این گیاهان نمونه‌برداری برگ و استخراج DNA و آزمون PCR به روش مرسوم در آزمایشگاه انجام شد و میزان حضور ژن مقاومت در نتاج هر یک از بذور S1 بدست آمد.

کشت اشتکلینگ[3] در مزرعه

بذر S1 برداشت شده از کیج‌ها پس از بوجاری در مزرعه اشتکلینگ در شهریور به صورت جداگانه کشت شدند. مراقبت‌های مرحله داشت شامل آبیاری، کوددهی و وجین علف‌های هرز در طول پاییز انجام گرفت و بوته‌ها در داخل مزرعه در طول فصل زمستان ورنالیزه شدند.

ارزیابی مولکولی گیاهان توده‌های گرده افشان S1 کشت شده در مزرعه

با توجه به نتایج آزمون مولکولی توده‌های گرده افشان که در گلخانه صورت گرفته بود و هیچ یک از توده‌ها از نظر ژن *Hs1* به صورت خالص نبودند،

1- Taq polymerase 2- Gel documentation 3- Steckling

Archive of SID

www.SID.ir

تصمیم گرفته شد که گیاهان اشتکلینگ مربوط به این توده‌ها پس از انتقال به مزارع ایزوله و استقرار و رشد بوته‌ها و قبل از گلدهی، با استفاده از نشانگر مولکولی غربال شوند، به طوری که فقط بوته‌های حامل ژن *Hs1* باقی بمانند و حساس‌ها حذف شوند.

شکل ۱- نتایج آزمون PCR با آغازگر اختصاصی ژن $Hs1^{pro-1}$ در تعدادی از تک بوته‌ها.
M: نشانگر تعیین اندازه DNA. ستون یک گیاه شاهد مقاوم واجد ژن مورد نظر (رقم نماکیل).
ستون ۲ گیاه شاهد حساس فاقد ژن مورد نظر (رقم رسول) و ستون‌های ۲۱-۳ تک بوته‌هایی
از توده اصلاحی چغندرقند که در تعدادی از آنها محصول ۱۳۲۳ جفت بازی حاصل
از تکثیر ژن $Hs1^{pro-1}$ دیده می‌شود.

نتایج و بحث

ارزیابی مولکولی سال اول

نتایج انگشت‌نگاری نمونه‌ها و مقایسه الگوی نوارهای DNAی گیاهان مورد بررسی به همراه شاهدهای حساس و مقاوم به نماتد، در شکل یک نشان داده شده است. آغازگر اختصاصی ژن $Hs1^{pro-1}$ در تعدادی از گیاهان مقاوم تولید محصول ۱۳۲۳ جفت بازی مورد انتظار را نمود.

لنگ و دی بوک (۱۲) با مشاهدهٔ حضور نشانگر Sat-121 در گیاهانی که یک قطعه و یا کل کروموزوم شمارهٔ یک از *B.patellaris* یا *B.procumbens* به آنها اضافه شده بود، بیان کردند توالی فوق می‌تواند به عنوان نشانگر محل ژنی ژن(های) $Hs1^{pro-1}$ و $Hs1^{pat-1}$ به کار برده شود. همبستگی توالی تکراری Sat-121 با محل ژنی $Hs1^{pro-1}$ توسط سالنتین و همکاران (۱۹) با دو جمعیت مختلف تلاقی برگشتی مورد آزمایش قرار گرفت. تفاوت در الگوی باند دهی وجود باند حدود ۱۵۹ جفت بازی در گیاهان مقاوم در مقابل عدم حضور این باند در گیاهان حساس بود. نوروزی (۱۸) با غربال مولکولی ۱۵ توده اصلاحی چغندرقند که از تلاقی چغندر زراعی (*Beta vulgaris* L.) با لاین جابجائی W-1009 (با منشاء *B. procumbens*) بدست آمده بودند، نتیجه گرفت که نشانگر ژن $Hs1^{pro-1}$ به خوبی قادر به تفکیک ژنوتیپ‌های حساس از مقاوم می‌باشد. در تحقیق حاضر، ریشه‌های حامل ژن مقاومت $Hs1^{pro-1}$ از نظر شکل ظاهری، وزن ریشه و علائم گال با یکدیگر متفاوت بوده که نتایج آن در جدول ۱ خلاصه شده است. وجود گال احتمالا به دلیل انتقال بخشی از کروموزوم گونه بتا پروکامبنس به چغندر زراعی است که در نمونه‌هایی که حامل ژن مقاومت بوده ولی فاقد علائم گال هستند

Archive of SID

www.SID.ir

احتمالاً در طی میوز قطعات ژنی مرتبط با گال را از دست داده اند. از ریشه‌های حامل ژن مقاومت و فاقد علائم گال برای تولید نسل S1 استفاده گردید.

جدول ۱- وضعیت ریشه های منتخب حامل ژن مقاومت $Hs1^{pro-1}$ و میزان بذر S1 حاصل از تک ریشه‌ها

ردیف	شماره ریشه	علائم گال ریشه	وزن ریشه (گرم)	شکل ظاهری ریشه	میزان بذر S1 (گرم)
۱	BC-N1	بدون گال	۷۵۰	طبیعی کشیده	عدم ساقه روی و گلدهی
۲	BC-N2	حامل ۴ گال بزرگ	۷۵۰	کشیده دارای انشعاب	۱۳۵
۳	BC-N3	حامل ۵ گال کوچک	۵۵۰	کشیده	۱۵
۴	BC-N5	بدون گال	۳۰۰	طبیعی کشیده	۱۳۵
۵	BC-N6	بدون گال	۲۰۰	طبیعی	حذف در مزرعه
۶	BC-N7	بدون گال	۲۰۰	طبیعی	۱۰
۷	BC-N8	یک گال بزرگ	۲۰۰	منشعب	۲۸
۸	BC-N9	بدون گال	۱۵۰	طبیعی	۲۳
۹	BC-N10	بدون گال	۱۵۰	طبیعی	۲۰عدد
۱۰	BC-N11	بدون گال	۱۵۰	طبیعی	۲۰
۱۱	BC-N12	بدون گال	۱۵۰	طبیعی	۲۰
۱۲	BC-N13	بدون گال	۷۵	طبیعی	حذف در مزرعه
۱۳	BC-N14	بدون گال	۷۵	طبیعی	۱
۱۴	BC-N15	بدون گال	۷۵	طبیعی	حذف در مزرعه

ارزیابی مولکولی سال دوم

میزان حضور ژن مقاومت دربین گیاهان مربوط به نتاج S1 بین ۲۵ تا ۶۳ درصد متفاوت بود (جدول ۲) که احتمالا به علت هتروزیگوت بودن گیاه والدی آنها بوده است. البته احتمال وجود لوپ در مرحله میوز در گیاه والدی که باعث از دست رفتن ژن *Hs1* در گامت‌ها شده و بخشی از نتاج فاقد ژن مربوط خواهند شد را نیز بایستی در نظر گرفت. به هرحال با توجه به درصد حضور ژن مقاومت، عدم تشکیل گال در ریشه گیاه والدی و داشتن گیاه اشتکلینگ کافی در مزرعه، از بین S1های کشت شده در مزرعه، شماره‌های N11 و N12 جهت انتخاب تک بوته برای تولید مجدد بذر S1 در سال بعد انتخاب شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- نتایج آزمون مولکولی گیاهان S1 گلخانه‌ای و وضعیت گال در ریشه گیاه والدی آنها

ردیف	شماره لاین در گلخانه	گال ریشه	تعداد گیاهان PCR شده	تعدادگیاهان $Hs1^+$	درصد $Hs1^+$
۱	N2	+	۱۲	۴	۳۳
۲	N3	+	۳۰	۱۹	۶۳
۳	N5	-	۱۲	۴	۳۳
۴	N7	-	۱۱	۷	۶۴
۵	N8	+	۱۱	۶	۵۵
۶	N9	-	۱۲	۳	۲۵
۷	N11	-	۵۱	۱۴	۲۸
۸	N12	-	۶۹	۳۵	۵۱
۹	N14	-	۱۲	۶	۵۰

ارزیابی مولکولی سال سوم

میزان حضور ژن مقاومت دربین گیاهان مربوط به نتاج S1 بین ۳۹ تا ۸۰ درصد متفاوت بود (جدول ۳) که احتمالا به علت هتروزیگوت بودن گیاه والدی آنها بوده است. بر اساس اظهارات سالنتین و همکاران (۱۹) در نتاج حاصل از لاین جابجایی (W1009) حدود ۴۵/۱۶٪ نوار مربوط به *Hs1* دیده شد. نتایج معدنی (۱۳) نیز نشان داد که درصد حضور ژن مقاومت در بین توده‌های اصلاحی بسیار متغیر است و از مجموع ۶۰ گیاه مقاوم به نماتد حدود ۲۷ درصد، نوار مربوط به ژن $Hs1^{pro-1}$ را نشان دادند.

جدول ۳- نتایج آزمون مولکولی گیاهان گلخانه‌ای و نمره رشد آنها در گلدان با مقیاس ۱ تا ۵

ردیف	شماره لاین در گلخانه	تعداد گیاهان آزمون شده	تعداد گیاهان مثبت $Hs1^{pro1}$	درصد گیاهان مثبت $Hs1^{pro1}$	نمره رشد	شماره لاین در اشتکلینگ
۱	N11-49	۳۰	۲۴	۸۰	۵	N1-1
۲	N12- 3	۱۸	۱۰	۵۶	۳/۵	N1-2
۳	N12- 6	۱۸	۷	۳۹	۳	N1-3
۴	N12-11	۴۵	۳۱	۶۹	۳/۵	N1-4
۵	N12-16	۱۸	۹	۵۰	۳	N1-5
۶	N12-18	۴۵	۲۹	۶۴	۳	N1-6
۷	N12-20	۱۸	۹	۵۰	۳	N1-7

موسسات خصوصی اصلاح بذر چغندرقند در کشورهای اروپایی با استفاده از خاصیت ترکیب پذیری لاین‌های جابجایی[1] حامل ژن *Hs1* با ژنوتیپ‌های چغندرقند موفق به تولید ارقام تجارتی چغندرقند مقاوم به نماتد شده‌اند که در سطح تجارتی امروزه استفاده می‌گردد. در طی سال‌های اخیر با تلاش محققان موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند تلاقی‌هایی بین

1- Translocation lines

Archive of SID

www.SID.ir

رگه‌های زراعی چغندرقند با این جابجایی حامل ژن *Hs1* از گونه *procumbens* انجام گردیده و توده‌های اصلاحی مقاوم به نماتد بدست آمده است (۱۵). با ارزیابی اینتوده‌ها معلوم شده است که در بین ژرم پلاسم‌های مورد ارزیابی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (۲۲). همچنین از آنجائیکه تلاقی بین هیبریدها و چغندرقند بر مبنای نرعقیم ژنتیکی اتایپ‌های موجود انجام گرفت، بنابراین نسبت ژنوتیپ‌های حفظ کننده نرعقیمی در این توده‌ها افزایش یافته است و پس از دو نسل احتمال تشخیص اتایپ‌های متحمل از داخل این توده‌ها میسر است و در صورت اصلاح والدین مناسب و تلاقی‌های ممکن بین آنها در برنامه معرفی رقم جدید قرار خواهند گرفت (۱۵).

لنگ و دی باک (۱۲) و کلاین و همکاران (۱۱) بیان کردند که مقاومت به نماتد می‌تواند توسط پاتوتایپ بیماریزای نماتدمولد سیست شکسته شود. بنابراین ژن‌های مقاوم جدیدی باید در ارقام چغندرقند معرفی و اصلاح شوند تا یک مقاومت پایدار بدست بیاید. در ژرم پلاسم وحشی چغندر حداقل دو ژن مقاوم دیگر (روی کروموزوم‌های ۷ و ۸) وجود دارد (۱۱). بنابراین مجموع ژن‌های *Hs1*، *Hs2* و *Hs3* در یک رقم می‌توانند یک مقاومت پایدار را بوجود آورند. در حال حاضر شرکت‌های خصوصی تولید بذر در اروپا مثل KWS و واندرهاو[1] با استفاده از منابع مقاومت تک ژنی و چند ژنی اقدام به تهیه ارقام مقاوم به نماتد نموده‌اند و ارقامی با مقاومت تک ژنی در سطح تجاری به بازار عرضه شده است. در داخل کشور با توجه به وسعت آلودگی مزارع چغندرقند به نماتد در استان‌های خراسان، اصفهان، آذربایجان غربی و فارس، نیاز به معرفی ارقام تجاری مقاوم به نماتد محسوس است. بنابراین ضروری به نظر می‌رسد بتوان با بهره‌گیری از روش‌های نوین به‌نژادی در موسسه تحقیقات چغندرقند به ارقامی تجارتی دست یافت که برای مناطق آلوده به نماتد در کشور قابل استفاده باشند. البته هنوز گزارشی در مورد تهیه ارقام تجارتی حامل ژن‌های مقاومت *Hs2* و *Hs3* از سوی شرکت‌های تولیدکننده بذر چغندرقند منتشر نشده است.

در مجموع با توجه به آنکه حضور نشانگر مولکولی حاصل همواره مقاومت فنوتیپی گیاهان مورد آزمون را در توده‌های اصلاحی با منشاء ژنتیکی مختلف نشان داده است (۱۸،۱۷)، می‌توان از این نشانگر در غربال ژنوتیپ‌های چغندرقند مقاوم به نماتدمولد سیست در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود و بدین ترتیب در مراحل تهیه رقم، زمان اصلاح را کاهش و دقت انتخاب تک بوته‌ها و در نتیجه سودمندی انتخاب را افزایش داد.

در این تحقیق از منابع اصلاحی مقاوم به نماتد که در سال‌های اخیر در موسسه

1- Vanderhave

Archive of SID

www.SID.ir

بدست آمده است، جهت تهیه والد گردهافشان برای ارقام تجارتی چغندرقند مقاوم به نماتد استفاده شد و بر اساس انتخاب ژنوتیپی تعدادی توده S1 مقاوم به نماتدمولد سیست بدست آمد که پس از تلاقی با والد مادری و تعیین قدرت ترکیپ پذیری بهترین آنها به عنوان والد گردهافشان (پدری) در تهیه بذر هیبرید تجارتی استفاده خواهند شد.

همچنین برای تهیه لاینهای هموزیگوت مقاوم پیشنهاد میشود تعدادی بوته از توده گردهافشان مقاوم در مزارع سلکسیون کشت شوند تا پس از انتخاب بوتههای حامل ژن مقاومت در آینده از آنها مجددا بذر S1 تهیه و جهت یافتن لاین صددرصد خالص افراد توده‌های S1 آزمون مولکولی شوند.

منابع

1. Abdollahian, M. 2012. Utilization Statistics of sugar factories of Iran. http://www.sbsi.ir/sugar_facts. (In Persian)
2. Ahmadi, A., A. SharifiTehrani, A. Kheiri and G. Hajarood. 1998. Isolaion of *Paecilomycesspp*and*Fusariumsolani* and their efficiency in biological control of nematode eggs in lab conditions. Iranian Journal of plant pathology, 34: 186-197. (In Persian)
3. Cai, D., M. Kleine, S. Kifle, H.J. Harloff, N.N. Sandal, K.A. Marcker, R.M.K. Lankhorst, E.M.J. Salentijn, W. Lange, W.J. Stiekema, U. Wyss, M.W. Grundler and C. Jung. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science, 275: 832-834.
4. De Bock, T.S.M. 1986. The genus *Beta* domestication, taxonomy and interspecific hybridizatin for plant breeding. Acta Horticulture, 182: 334-335.
5. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.
6. Doney, D.L. and E.D. Whitney. 1969. Screening sugar beet for resistance to Heteroderaschachtii. Journal of American Society Beet Technologists. 15: 546-552.
7. Draycott, A.P. 2006. Sugar Beet (World Agriculture Series). Wiley-Blackwell. London. 496 pp.
8. Francis, S.A., M. Redfearn, D.M. Chwarszczynska and M.J.C. Asher. 1998. Use of molecular markers in breeding for disease resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). In: Protection and production of sugar beet and potatoes (by Dale, M.F.B., A.M.Dewar, S.J. Fisher, P.P.J. Haydock, K.W.Jaggard, M.T. May, H.G. Smith, R.M.J.Storey and J.J Wiltshire) Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology, 52: 14-16 December. Churchill College, Cambridge.
9. Heijbrock, W. 1977. Partial resistance of sugar beet to beet cyst eelworm (*Heteroderaschachtii*). Euphytica, 26: 257-262.
10. Jung, C., D. Cai and M. Kleine. 1998. Engineering nematode resistance in crop species. Trends in Plant Science, 3(7): 266-271.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Kleine, M., H. Voss, D. Cai and C. Jung. 1998. Evaluation of nematode resistant sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) lines by molecular analysis. Theoretical and Applied Genetics, 97: 896-904.
12. Lange, W. and T.S.M. De Bock. 1994. Pre-breeding for nematode resistance in beet. Journal of Sugar Beet Research, 31: 13-26.
13. Madani, F. 2005. To determine correlation between beet cyst nematode resistance and *Hs1* gene molecular marker in progenies derived from back cross and selfing of resistance plants. M.Sc. degree thesis. Agricultural biothechnoloy Dept. Science and Research Unit. Islamic Azad University, 102 pp. (In Persian)
14. Mesbah, M., T.S.M. Bock, J.M. Sandbrink, R.M.K. Lankhorst and W. Lange. 1997. Molecular and morphological characterization of monosomic additions in *Beta vulgaris*, carrying extra chromosomes of *B. procumbens* or *B. patellaris*. Molecular Breeding, 3: 147-157.
15. Mesbah, M., P. Norouzi, S.B. Mahmoudi, M. Baghaeikia, S. Vahedi, R. Parvizi and J. Soltani. 2005. To transfer beet cyst nematode resistance genes from *B. maritima* to *B. vulgaris* L. Final report of project. Sugar Beet Seed Institute. 23 pp. (In Persian)
16. MohammadiGoltapeh, A., B. Pakdaman and Y. Rezaei Danesh. 1999. Biotic diseases in sugar beet. TarbiatModarres Univ. Publishing, 84-891. pp. (In Persian)
17. Norouzi, P. 2003. Application of molecular markers in sugar beet breeding. Plant breeding workshop manual. Sugar Beet Seed Institute, 30-37 pp. (In Persian)
18. Norouzi, P. 2007. Screening of plants resistance to beet cyst nematode by using molecular marker. The Second National Congress of Molecular and Cellular Biology. Kerman. 9-10 Bahman. (In Persian)
19. Salentijn, E.M.J. 1995. Molecular characterization of the beet cyst nematode (*Heteroderaschachtii*) resistance locus *Hs1*. Ph.D Thesis. Wageningen University. Netherlands, 75-88 pp.
20. Sandal, N.N., E.M.J. Salentijn, M. Kleine, D. Cai, M.R. Reuver, M.V. Druten, T.S.M. Bock, W. Lange, P. Steen, C. Jung, K. Marcker, W.J. Stiekema and R.M.K. Lankhorst. 1997. Backcrossing of nematode-resistant sugarbeet: a second nematode resistance gene at the locus containing $Hs1^{pro-1}$. Molecular Breeding, 3: 471-480.
21. Soltani, J. 2006. Evaluation of resistance of internal and forien commercial varieties against beet cyst nematode.Final report of project. Sugar Beet SeedInstitute. 20 pp. (In Persian)
22. Vahedi, S. and S.B. Mahmoudi. 2006. Evaluation of resistance of new sugar beet breeding populations to beet cyst nematode. Project annual report. Plant Breeding Dept. Sugar Beet Seed Institute. 32 pp. (In Persian)
23. Vahedi, S., P. Mehdikhani, J. Soltani and S.B. Mahmoudi. 2007. Evaluation of resistance of new sugar beet breeding populations to beet cyst nematode. Final report of project. Sugar Beet Seed Institute. 42 pp. (In Persian)
24. Whitney, E.D. and E. Duffus. 1991. Compendium of Beet Diseases and Insects, APS Press. 76 pp.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular Evaluation and Increasement of Cyst Nematode Resistance Gene Frequency During Several Generations of Self Pollination in Sugar Beet

Peyman Norouzi[1]

1- Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute (Corresponding author: norouzi@sbsi.ir)
Received: October 30, 2012 Accepted: July 9, 2013

Abstract

In order to increase beet cyst nematode resistance gene frequency, one population named 261*(20314*W-1009) that contains Hs1pro-1 was used in present research. In first year, the population was planted in selection plotes in field. Single plants were labeled and leaf samples were prepared. Then DNA extraction from leaves was done and molecular analysis of plants containing resistance gene accomplished using STS marker and specific PCR test. In second year, gall signs onto resistant vernalized roots were noted and the roots were planted under cages in isolated plots to produce S1 seeds. The S1 seeds were sowed in greenhouse for molecular analysis and in the steckling field to produce the roots. The roots were vernalized in the field in winter season. The molecular results of the S1 plants by Hs1pro-1 marker showed that presence of the resistant gene among the S1 lines is varied 25 to 63 percent. In third year, the vernalized roots were planted under cages in isolated plots to produce new S1 seeds. The new S1 seeds were grown in greenhouse for molecular analysis. The molecular results of the new S1 plants by Hs1pro-1 marker showed enhancement of the resistant gene among the S1 lines that varied 39 to 80 percent. The results showed that resistance gene frequency can be increased by increasing in selfing number and genotypic selection by molecular marker.

Keywords: Sugar beet, CYST nematode, Resistance, Pollinator, Diploid, Molecular marker

Archive of SID

www.SID.ir