Archive of SID

ارزیابی مقاومت نسبی توتون نسبت به ویروس Y سیب‌زمینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR)

Evaluation of Relative Resistance of Tobacco to Potato Virus Y Using Microsatellite Markers (SSR)

مرضیه شازده احمدی[۱*] و محمدرضا صلواتی میبدی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۶/۲۹

چکیده

توتون، یکی از گیاهان مهم صنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولیدکننده نقش بسیار مهمی دارد. Potato Virus Y یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی خسارت‌زا روی توتون است و باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول توتون می‌گردد. ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) متعلق به جنس *Potyvirus* است که گیاهان خانواده سولاناسه مانند سیب‌زمینی، توتون و گوجه‌فرنگی را آلوده می‌کند. مؤثرترین و بهترین روش برای کاهش خسارت این ویروس، اصلاح ارقام مقاوم یا متحمل نسبت به این ویروس است. نشانگرهای DNA پیوسته با ژن‌های مقاومت و دارای چندشکلی زیاد، مانند نشانگرهای SSR می‌توانند در تسریع برنامه‌های اصلاح ارقام مقاوم مفید باشند. این تحقیق به‌منظور ارزیابی مقاومت نسبی توتون نسبت به بیماری ویروس Y سیب¬زمینی با استفاده از نشانگرهای SSR اجرا شد. جهت اجرای این تحقیق رقم VAM مقاوم به ویروس PVY با رقم K326 حساس به این بیماری تلاقی داده شد. تلاقی اولیه در سال ۱۳۸۹ انجام شد، در سال ۱۳۹۰ بذور F1 کشت شده و بذور F2 به‌دست آمده بود. بذور F2 حاصل در سال ۱۳۹۰ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش کشت شدند. در طول دوره رشد، عملیات زراعی لازم به موقع انجام پذیرفت و ارزیابی مزرعه‌ای (مورفولوژیکی) از نظر علائم آلودگی به بیماری PVY از بین گیاهان کشت شده در مزرعه هر دو هفته یک‌بار صورت گرفت. سپس، گیاهان F2 به‌دست آمده با جدایه خالص‌سازی شده سویه O ویروس PVY مایه‌زنی شدند. در ادامه کار از تعداد ۱۰ بوته متحمل و ۱۰ بوته حساس، براساس علایم مزرعه‌ای نمونه برگ تهیه گردید. روی این نمونه‌ها برای تأیید مقاومت و حساسیت به PVY آزمون الایزا انجام شد و براساس نتایج الایزا ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم شناسایی شدند. DNAی مربوط به بوته‌های والد حساس و مقاوم به بیماریPVY به‌طور جداگانه به روش دلاپورتا استخراج شده و جهت تهیه نمونه‌های بالک (توده) حساس و مقاوم، DNAی نمونه‌های حساس با یکدیگر و DNAی نمونه‌های مقاوم با هم مخلوط شدند. در ادامه ۱۰۰ جفت آغازگر SSR انتخابی روی دو رقم والدینی تست شد. نتایج نشان داد که از بین ۱۰۰ جفت آغازگر مورد استفاده در این تحقیق، ۲۸ جفت آغازگر توانستند الگوی نواربندی متفاوتی را برای هر نشانگر در بین والدین مقاوم و حساس به PVY نشان دهند. در مرحله بعد این ۲۸ نشانگر بر روی بالک حساس و مقاوم تست شد تا نشانگر پیوسته با ژن مقاومت شناسایی گردد. مشخص شد که ۳ نشانگر SSR (PT30002)، (PT20165)، (PT20357) دارای بیشترین چندشکلی بوده و می‌توانند به‌عنوان نشانگر پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در برنامه‌های اصلاحی توتون مدنظر قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: توتون، PVY، چندشکلی، نشانگر ریزماهواره، جفت آغازگر

۱. محقق بخش بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران

۲. معاون پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران

*: نویسنده مسوول Email: Noshinshazdeahmadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

توتون یکی از گیاهان مهم صنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولیدکننده نقش بسیار مهمی دارد (خواجه‌پور، ۱۳۸۵). بیماری PVY متعلق به جنس *Potyvirus* است که گیاهان خانواده سولاناسه مانند سیب‌زمینی، توتون، گوجه فرنگی و فلفل را آلوده می‌کند. ویروس PVY به‌صورت ناپایا به‌وسیله شته سبز هلو (*Myzus persicae*) و از راه مکانیکی منتقل می‌شود. بیماری PVY باعث ایجاد علایم روشنی یا زردی رگبرگ‌ها، لکه‌های نکروتیک یا (قهوه‌ای شدن رگبرگ‌ها)، رگبرگ نواری، علائم موزاییکی، نکروز رگبرگ‌های اصلی و فرعی و گاهی نکروز ساقه می‌شود. میزان خسارت بسته به عوامل مختلف ازجمله ژنوتیپ توتون و زمان وقوع آلودگی متفاوت است. میزان خسارت این بیماری در توتون زیاد بوده و بین ۴۰-۱۰۰ درصد گزارش شده است *رینولدز* (Reynolds, 2011). بهترین و مؤثرترین روش برای کاهش خسارت ویروس PVY روی توتون، اصلاح و تولید ارقام مقاوم یا متحمل نسبت به این بیماری است. اصلاح برای مقاومت به این بیماری، از طریق روش‌های کلاسیک، مشکل و مستلزم صرف هزینه‌های زیادی است. می‌توان به‌جای استفاده از انتخاب فنوتیپی در روش‌های اصلاحی، گیاهان موردنظر را توسط نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوتیپی تفکیک نمود. استفاده از نشانگرهای مولکولی، روشی سریع‌تر و مطمئن‌تر است. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ابزار ارزشمندی برای به‌نژادی گیاهان و به‌ویژه شناسایی ژرم‌پلاسم در بانک ژن، ارزیابی روابط خویشاوندی و انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای مقاومت به آفات، بیماری‌ها و برخی صفات مطلوب هستند. استفاده از این نشانگرها امکان انتخاب گیاهان مطلوب را درون جمعیت در حال تفرق مستقیماً و براساس ژنوتیپ به جای فنوتیپ فراهم می‌کند *مون* و همکاران (Moon *et al.*, 2008). اولین قدم برای تولید ارقام مقاوم، شناسایی ژن یا ژن‌های مقاومت به بیماری PVY در توتون می‌باشد. ریزماهواره‌ها یا ردیف‌های تکراری ساده (SSR) تکرارهای پشت سر هم کوچکی از DNA هستند که معمولاً دو تا پنج جفت باز طول داشته و در ژنوم اغلب یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند. نشانگرهای SSR (ریزماهواره‌ها) یکی از مهم‌ترین نشانگرهای مولکولی می‌باشند که به‌دلیل فراوانی و سطوح چند شکلی بالا، پراکندگی یکنواخت در طول ژنوم، نحوه توارث هم بارز و کم هزینه بودن، درجه بالایی از تنوع آللی را نشان می‌دهند و بنابراین یک نشانگر مولکولی بسیار مناسب برای مکان‌یابی ژنتیکی، مطالعه جمعیت و شناسایی ژن‌های مقاومت در گیاهان می‌باشند *نقوی* و همکاران (Naghavi *et al.*, 2005). *سرناک* و همکاران (Cernak *et al.*, 2008) بیان کردند که ارزیابی مورفولوژیکی مقاومت به بیماری PVY، مشکل، پرهزینه و مستلزم صرف زمان زیادی است. نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزارهای کارآ و مؤثر برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به بیماری، گزینش برای مقاومت را تسهیل کرده و امکان انتقال ژن‌های مقاومت از ارقام مقاوم به ارقام حساس را در زمان کوتاه‌تر و با دقت بیشتر فراهم می‌کنند. به همین دلیل شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، روشی سریع و راحت بوده و کمک زیادی به تولید ارقام مقاوم می‌کند *دینانت* و همکاران (Dinant *et al.*, 1993). تاکنون چندین محقق، بررسی‌هایی در مورد ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون انجام داده‌اند که از منابع مختلفی منشأ می‌گیرند. محل عامل مقاومت به بیماری PVY در توتون توسط *گوپتن و بورک* (Gupton and Burk, 1973) بررسی شده است. آنها بین رقم ویرجینیا A جهش یافته به‌عنوان والد نر و ۲۴ مونوسومی توتون تلاقی انجام دادند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که احتمالاً مقاومت به بیماری PVY در توتون، به یک ژن روی کروموزوم E مربوط می‌شود. *رودال* و همکاران (Rodal *et al.*, 2008) عملکردهای تکمیلی دو ژن مغلوب تعیین‌کننده دوام مقاومت به PVY 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 باعث ایجاد مقاومت به بیماری PVY در توتون می‌شود. نتایج آنها نشان داد که مقاومت توتون رقم VAM نسبت به بیماری PVY حداقل به‌وسیله دو ژن مغلوب به نام ژن *Va* و *Va2* تعیین می‌شود. *لویس* (Lewis, 2007) ژنوتیپ‌های *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana africana* که دارای مقاومت ژنتیکی نسبت به بیماری PVY هستند را بررسی و ارزیابی کرد. مشخص شد که در رقم *N. africana* یک ناحیه ژنومی اینتروگرسیون شده به‌نام (Nafr) وجود دارد که این ناحیه دارای یک ژن مغلوب مقاومت به PVY به‌نام ژن Va می‌باشد. *کزوباکا و دوروسزوکا* (Czubacka and Doroszewska, 2009) در نتیجه تحقیقات خود، توتون دابل هاپلوییدی را ایجاد کردند که دارای منابع مختلف مقاومت به بیماری PVY می‌باشد. آنها دریافتند که یکی از منابع مقاومت به PVY، گونه وحشی توتون به‌نام *Nicotian africana* می‌باشد. منبع دیگر مقاومت به PVY، لاین‌های ترانسژنیک توتون به‌نام (MN 944-LMV) و کولتیوار Mac Nair هستند که دارای ژن پروتئین پوششی LMV یا (LMV CP^{+}) هستند. که *ایچی* و همکاران (Keiichi *et al.*, 2004) یک نژاد جدید از

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس Y سیب‌زمینی را در توتون بارلی در ژاپن کشف کردند. مشخص شد که بر روی برگ‌های توتون بارلی، دو ایزوله A-1 و A-2 ایجاد لکه‌های زرد و نقاط حلقوی نکروزه قهوه‌ای و علائم سیستمیک می‌کنند. ایزوله A-1، واکنش مثبت نسبت به آلودگی PVY نشان داد. مشخص شد که ایزوله A-1 از ویروس Y سیب‌زمینی به گروهی از نژادهای نکروتیک PVY تعلق دارد. مکان‌یابی مولکولی ژن مقاومت به بیماری PVY (ژن *Rysto*) در سیب‌زمینی توسط *بریگنتی* و همکاران (Brigenti *et al.*, 1998) بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن *Rysto* یک ژن غالب است که مقاومت به بیماری PVY را در سیب-زمینی ایجاد می‌کند. چنانچه صفاتی مانند مقاومت به بیماری‌ها را بتوان به‌وسیله پیوستگی با نشانگرهای مولکولی نشانمند نمود، زمان و هزینه لازم برای انتقال این ژن‌ها از یک زمینه ژنتیکی به دیگری و بنابراین بهبود ارقام مقاوم به‌شدت کاهش خواهد یافت. در روش MAS از آلل و مکان ژنی یک نشانگر که پیوسته به آن بیماری است، برای تعیین وجود آن بیماری استفاده می‌شود. این موضوع، امکان گزینش سریع و دقیق ژنوتیپ‌های مطلوب را در مراحل اولیه رشد فراهم کرده و طول دوره به‌نژادی را کوتاه می‌نماید. روش MAS کارآیی بالای انتخاب و کاهش تعداد لاین‌هایی که باید در صفات زراعی تست شوند را فراهم می‌کند *بارون* (Barone, 2004). روش انتخاب به کمک نشانگر (MAS) توسط چندین محقق برای شناسایی نشانگرهای پیوسته به ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها مطالعه و بررسی شده است. ازجمله: *بریگنتی* و همکاران (1998) با استفاده از روش MAS و نشانگرهای AFLP، مکان‌یابی مولکولی ژن مقاومت به ویروس PVY (ژن *Rysto*) را بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که ژن *Rysto* یک ژن غالب است که مقاومت به ویروس PVY را در گیاه سیب‌زمینی ایجاد می‌کند. *مون* و همکاران (2008) از روش MAS برای شناسایی نزدیکترین نشانگرهای AFLP پیوسته به ژن مقاومت به بیماری TSWV در توتون استفاده کردند، مشخص شد که نشانگر RWZ02 دارای بیشترین چندشکلی بوده و پیوسته به ژن مقاومت به بیماری TSWV در توتون می‌باشد. *بارون* (2004) نشانگرهای پیوسته به مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری در برنامه انتخاب به کمک نشانگر (MAS) در گوجه‌فرنگی را مورد مطالعه و بررسی قرار داد. نتایج تحقیق وی مشخص کرد که مقاومت به بیماری PVY در گوجه‌فرنگی توسط یک ژن غالب به نام Pot-1 کنترل می‌شود که این ژن بر روی کروموزوم شماره ۳ از ژنوم گوجه‌فرنگی قرار دارد. *فونتس* و همکاران (Fuentes *et al.*, 2000) با استفاده از روش MAS نشانگرهای SSR پیوسته به ژن مقاومت به بیماری بلاست برنج (ژن *Pi-1*) را شناسایی کردند. آنها در تحقیق خود، ۲۶ نشانگر SSR را روی نتاج F2 تست کردند و از بین آنها ۳ نشانگر SSR پیوسته به ژن مقاومت به بیماری بلاست برنج (ژن *Pi-1*) به نام‌های RM1233، RM5926 و RM224 دارای بیشترین چندشکلی بودند که این نشانگرها می‌توانند در برنامه انتخاب به کمک نشانگر (MAS) در اصلاح ارقام برنج برای بیماری بلاست برنج مفید واقع شوند. در این آزمایش استفاده از نشانگرهای SSR به‌عنوان ابزاری مناسب و کارآ در ارزیابی و انتخاب نشانگرهای پیوسته به ژن مقاومت به بلاست در ژنوتیپ‌های برنج تأیید شد. از آنجایی که هنوز تاکنون هیچ‌گونه بررسی و تحقیقی در مورد شناسایی نشانگر SSR پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون در داخل و خارج از کشور صورت نگرفته است، لذا هدف از این تحقیق، ارزیابی مقاومت نسبی توتون نسبت به بیماری ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و نیز گزینش و شناسایی نشانگرهای پیوسته به PVY در توتون با استفاده از روش انتخاب به کمک نشانگر (MAS) بود تا در برنامه‌های اصلاحی و ایجاد ارقام جدید مقاوم به بیماری PVY در توتون به‌کار برده شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق، جمعیت F2 حاصل از تلاقی رقم K326×VAM بود. ۱۰۰ بذر F2 حاصل از این تلاقی در سال ۱۳۹۰ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش کشت گردیدند و آنها در مرحله سه برگی با عصاره ویروس PVY مایه‌زنی شدند و با انجام آزمون الایزا ، تعداد ۱۰ بوته کاملاً مقاوم و ۱۰ بوته کاملاً حساس به PVY انتخاب شده و از هر کدام از آنها به طور جداگانه نمونه برگ تهیه شد. نمونه‌ها در ازت مایع گذاشته شد و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا برای مراحل بعدی کار و ارزیابی‌های مولکولی از آنها استفاده گردد.

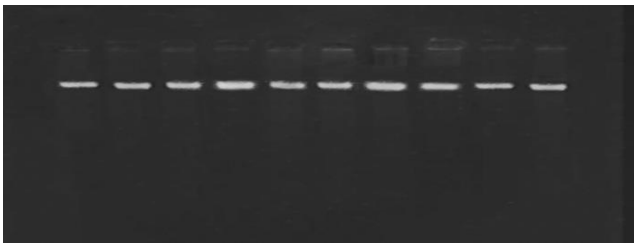
استخراج DNA

DNA ژنومی از برگ‌های جوان والدین و نیز از هر یک از ۱۰ بوته مقاوم و حساس به PVY به‌طور جداگانه با استفاده از روش *دلاپورتا* و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج 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 میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی-لیتری منتقل شد. سپس مقدار ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج

www.SID.ir

Archive of SID

مخصوص *دلاپورتا* که از قبل در بن ماری تا دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرم شده بود، به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه‌ها هر ۱۰ دقیقه به آرامی با دست تکان داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم پنج مولار اضافه شد و میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس DNA توسط محلول کلروفرم: ایزوآمیل الکل جدا شد و سانتریفیوژ شد و محلول روئی آن دور انداخته شد. سپس میکروتیوب‌ها با الکل۷۰٪ شستشو داده شدند و خشک شدند. در آخر، برای حل‌شدن کامل DNA، رسوب‌های DNA در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شدند. میکروتیوب‌ها به‌مدت یک شب در یخچال معمولی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از حل شدن کامل DNA، برای ارزیابی کمیت DNA، غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و طیف سنجی نوری با طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز افقی ژل آگارز ۰/۸٪ انجام شد و تصویر ژل توسط دستگاه ژل دااک عکس‌برداری شده و مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱: نمایی از DNA استخراج شده به روش *دلاپورتا* و همکاران
Fig. 1: View of DNA extracted with Dellaporta method

تست الیزا

بعد از انتقال نشاهای گیاهان به زمین اصلی و رسیدن به مرحله ۵-۴ برگی، مایه‌زنی مکانیکی با عصاره ویروس Y سیب‌زمینی صورت گرفت. جهت تأیید آلودگی یا عدم آلودگی بوته‌ها به PVY بوته‌ها با آزمون دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) مطابق روش *کلارک و آدامز* (Clark and Adamz, 1977) با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال ویروس Y سیب‌زمینی مورد آزمایش قرار گرفتند. عصاره نمونه‌ها به داخل چاهک‌هایی که قبلاً با پادتن چند همسانه‌ای پوشش یافته بودند ریخته شد. پلت‌ها پس از یک شب نگهداری در یخچال شسته شدند. در مراحل بعدی، به ترتیب از پادتن مخلوط شده با آنزیم آلکالین فسفاتاز و سوبسترای آنزیم (پارانیترو فنیل فسفات) استفاده شد. پس از ریختن سوبسترا و ظهور رنگ در چاهک‌ها نتایج آن به‌صورت چشمی خوانده شده و بررسی و ثبت گردید.

آغازگرهای SSR

۱۰۰ جفت آغازگر SSR مورد استفاده در این تحقیق از شرکت ندای فن خریداری شدند. این ۱۰۰ جفت آغازگر با استفاده از نقشه SSR توتون ارائه شده به‌وسیله مک کوچ و همکاران (Mackoch *et al*., 2008) طوری انتخاب شدند که اولاً توزیع یکنواختی روی ۲۴ کروموزوم توتون داشته باشند و ثانیاً فاصله بین هر دو نشانگر مجاور بیش از ۲۰ سانتی‌مورگان نباشد. این مواد به‌صورت منجمد و خشک و در غلظت (OD)های مختلف به‌وسیله شرکت سازنده تهیه شده بودند که براســاس نسبت به‌دست آمده از فرمول Pmol/ 2500 هر آغازگر را در مقدار معینی آب مقطر مخلوط کرده تا حجم نهایی آنها به ۵۰ میکرولیتر برسد و بدین‌ترتیب رقیق‌سازی آغازگرها صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از نشانگرهای SSR توتون

برای ایجاد بهترین شرایط PCR، غلظت‌های مناسب $MgCl_2$، آغازگر و DNA توسط آزمون گرادیان غلظت تعیین گردید. PCR در تیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر حجم کلی محلول واکنش شامل یک میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ ng/µl)، دو میکرولیتر $Mgcl_2$ (۰/۵ مولار)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (10X)، ۱۵/۷ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای SSR توتون رفت (F) و برگشت (R) تهیه شد. این مواد به‌طور جداگانه به هر یک از میکروتیوب‌های کوچک ۰/۲ mL منتقل شدند و در داخل دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Bio-Rad قرار داده شدند. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه، به‌دنبال آن ۳۵

www.SID.ir

Archive of SID

چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دماهای ۵۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی به‌مدت هشت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. بعد از اتمام مراحل PCR، مقدار هفت میکرولیتر از محصولات تکثیری به اضافه ۱/۵ میکرولیتر بافر بارگذاری درون چاهک‌های ژل آگارز ۱/۸٪ ریخته شدند.

تجزیه تفرق توده‌ای (Bulk segregant analysis, BSA)

برای شناسایی نشانگرهایی که همراه با ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون تفکیک می‌شوند، از آزمون تجزیه تفرق توده‌ای که توسط *میچل مور* و همکاران (Michelmore *et al.*, 1991) توضیح داده شد، با کمی تغییرات استفاده گردید. نمونه DNA استخراج شده از ۱۰ عدد از مقاوم‌ترین و ۱۰ عدد از حساس‌ترین گیاهان جمعیت F2 به‌طور جداگانه با یکدیگر مخلوط شده و توسط ۲۸ آغازگر SSR انتخابی از مرحله اول، تست و غربال شدند تا نشانگرهای نهایی پیوسته به بیماری PVY در توتون شناسایی گردند.

الکتروفورز عمودی و رنگ‌آمیزی ژل

جداسازی محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریلامید واسرشته‌ساز شش درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی ساخت شرکت Bio-Rad انجام و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره *بسام* و همکاران (Bassam *et al.*, 1991) به روش زیر صورت گرفت: اولین مرحله از (چهار مرحله رنگ‌آمیزی) به‌منظور جلوگیری از انتشار و پراکنده شدن DNA در بافت ژل انجام گرفت. در این مرحله شیشه کوچک به‌مدت ۴۰ دقیقه در تشتک حاوی محلول تثبیت‌کننده شامل: یک لیتر اسید استیک ۱۰ درصد (۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیداستیک) روی شیکر با دور ۱۰۰ قرار گرفت. سپس ژل طی سه مرحله دو دقیقه‌ای و هر بار توسط یک لیتر آب مقطر انجام گردید تا با حذف مواد ناخواسته و همچنین اسید، در رنگ‌آمیزی تداخل ایجاد نگردد. در مرحله‌ی بعد از محلول رنگ‌آمیزی جهت رنگ‌گیری ژل استفاده گردید. این محلول شامل یک گرم نیترات نقره، دو میلی‌لیتر فرم آلدئید و همچنین یک لیتر آب سرد می‌باشد. بهتر است فرم آلدئید را حین استفاده از محلول اضافه نمود چرا که فرم آلدئید در سرما تجزیه می‌شود. بعد از شستشو، شیشه کوچک به تشتک حاوی محلول رنگ‌آمیزی منتقل شد و به‌مدت۲۰ دقیقه روی شیکر به‌مدت یک دقیقه در ۷۵ دور تکان داده شد. در این مدت زمان نیترات نقره در حضور فرم آلدئید به‌دلیل داشتن یون مثبت به اسکلت DNA که دارای بار منفی است پیوند می‌خورد. پس از اتمام رنگ‌آمیزی، شیشه درون تشتک حاوی آب مقطر سرد ($4^{\circ}C$) غوطه‌ور شد. این عمل در حدود پنج ثانیه انجام شد تا نیترات نقره اضافه از بافت ژل خارج گردد. در مرحله‌ی سوم برای نمایان شدن باندها از محلول آشکارگر استفاده می‌شود. این محلول شامل یک لیتر آب مقطر، ۳۰ گرم کربنات سدیم، ۲ میلی‌لیتر فرم آلدئید و همچنین ۵۰۰ میکرولیتر محلول تیوسولفات سدیم می‌باشد. بعد از شستشو با آب سرد شیشه کوچک همراه با ژل درون این محلول شناور می‌شود. هرچه آشکارگر سردتر باشد باندها واضح‌تر خواهند بود. در مرحله‌ی آخر پس از ظاهر شدن باندها، محلول تثبیت‌کننده‌ی مرحله‌ی اول که عمل متوقف کردن ظهور باندها را نیز انجام می‌دهد و در حقیقت محلول متوقف‌کننده نیز می‌باشد، به محلول آشکارگر اضافه شد تا از ظهور بیشتر باندها جلوگیری شده و زمینه ژل سیاه نشود. بعد از خشک کردن شیشه بایند با استفاده از اسکنر، تصویر ژل اسکن گردید. الگوهای نواربندی حاصل به‌صورت وجود یا عدم وجود نوار امتیازدهی شدند. ژنوتیپ‌های دارای یک نوار (یک آلل) هموزیگوت و ژنوتیپ‌های دارای دو نوار(دو آلل) هتروزیگوت در نظر گرفته شدند. همچنین برای هر نشانگر آلل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به‌صورت ۱، ۲، ۳ و ... نام‌گذاری شده و برای برآورد فراوانی آللی هر جایگاه ریزماهواره استفاده شدند.

نتایج

ارزیابی مورفولوژیکی (مزرعه‌ای) بیماری PVY در والدین حساس و مقاوم به بیماری PVY

ارزیابی مزرعه‌ای و مورفولوژیکی بیماری PVY بر روی ارقام مقاوم و ارقام حساس هر ۱۰ روز یک‌بار انجام گرفت. والدین از نظر شدت بیماری تفاوت معنی‌دار نشان دادند، به‌طوری‌که والد مقاوم (رقم VAM) دارای کمترین میزان شدت بیماری بود و والد حساس (رقم K326) دارای بیشترین میزان شدت بیماری PVY بود. در شکل ۲ پیشرفت آلودگی لاین‌های والدینی در ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز پس از آلودگی اولیه نشان داده شده است. پیشرفت سریع بیماری PVY در لاین حساس (K326) از روز ۲۰ به بعد آغاز شد. لاین مقاوم دارای سرعت رشد بسیار کم و تقریباً خطی تا پایان دوره ارزیابی بیماری بودند. سه عامل محیطی افزایش دما، رطوبت و نور، عوامل موثر و مهم در شروع و گسترش بیماری PVY در توتون هستند

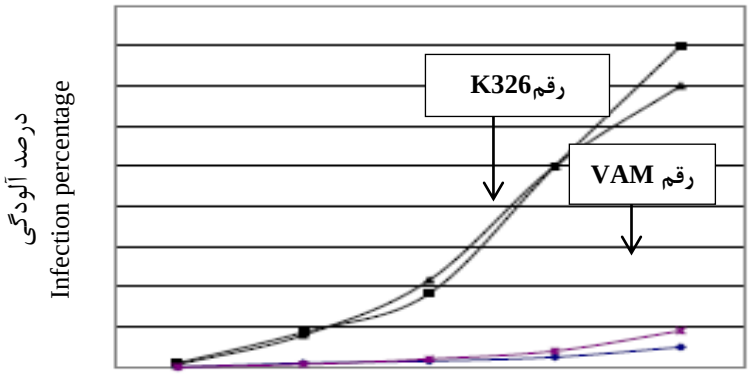
www.SID.ir

Archive of SID

(رینولدز، 2011). جهت تجزیه‌های آماری برای ارزیابی مقاومت به PVY تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver.16 و مقایسه میانگین دو رقم مقاوم و حساس از طریق آزمون t- t) (Test انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس برای صفت درصد بوته‌های آلوده به PVY در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲).

ارزیابی بیماری PVY با تست الایزا

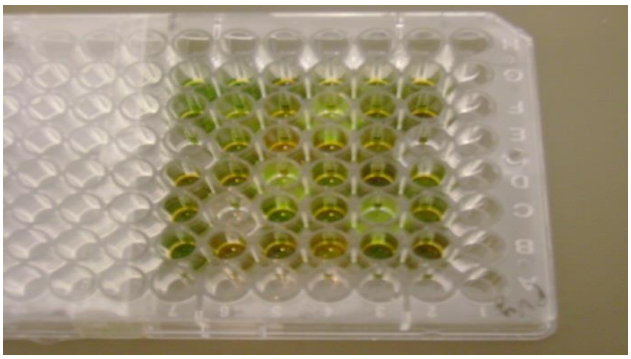
آزمون الایزا یک تکنیک بسیار خوب برای تشخیص نهایی و دقیق ویروسPVY می‌باشد. نتایج آزمون الایزا براساس تغییر رنگ چاهک‌ها (از بی‌رنگ تا زردرنگ) پس از ۳۰ الی ۱۲۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا بررسی گردید و به‌صورت چشمی خوانده شد، به‌طوری‌که چاهک‌های بدون رنگ پلیت، نشان‌دهنده پاسخ منفی واکنش نسبت به PVY بود و چاهک‌های زردرنگ پلیت، نشان‌دهنده پاسخ مثبت واکنش نسبت به PVY بود (شکل ۳).



شکل ۲: منحنی پیشرفت درصد بیماری PVY در ارقام والدینی
Fig. 2: Curve progression of PVY disease in parents

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس برای صفت درصد بوته‌های آلوده به بیماری PVY در دو ژنوتیپ مقاوم و حساس
Table 2: Analysis of variance for traits of plants infected with PVY disease in both resistant and susceptible genotypes

منابع تغییرات Source of changes	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square	F
ژنوتیپ Genotype	1	2.251	3.110**
خطا Error	2	0.124	
کل Total	5		



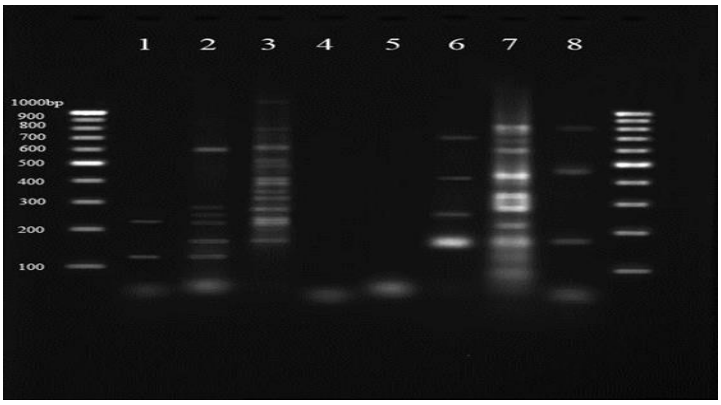
شکل ۳: نتایج ارزیابی بیماریPVY با تست الایزا در نتاج F2
Fig. 3: The results of PVY infection with ELISA in F2 population

www.SID.ir

Archive of SID

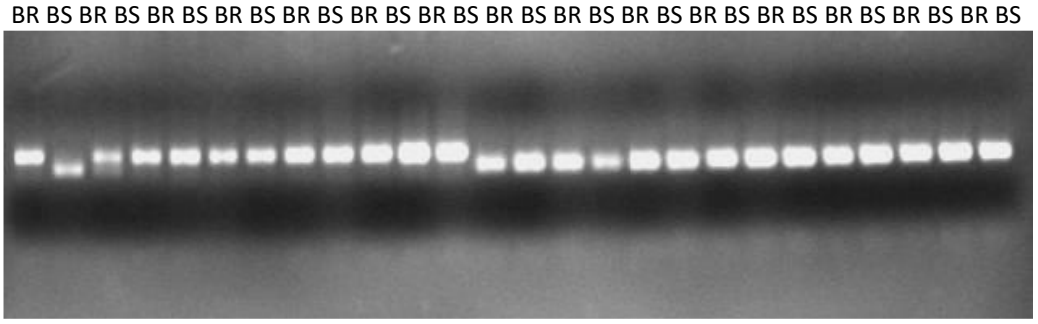
تجزیه نشانگرهای SSR با انجام الکتروفورز عمودی

پس از رنگ‌آمیزی و ثبت ژل‌ها، اطلاعات به‌دست آمده برای هر جفت آغازگر با توجه به وجود و عدم وجود هر باند امتیاز داده شد. والدی که دارای یک باند (یک آلل) در هر چاهک بود به‌عنوان هموزیگوت و والدی که دارای دو باند (دو آلل) در هر چاهک بود به‌عنوان هتروزیگوت در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که از بین ۱۰۰ جفت آغازگر مورد استفاده که فرآورده‌های PCR آنها، در ژل پلی‌آکریل‌آمید شش درصد الکتروفورز شده و ژل‌ها با محلول نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند، تنها ۲۸ جفت آغازگر SSR توانستند الگوی نواربندی متفاوت و پلی‌مورفیسم را برای هر نشانگر در بین والدین مقاوم و حساس به PVY نشان دهند (شکل ۴). شکل ۵، الگوی نواربندی نشانگر ریزماهواره PT20357 را در نتاج F2 نشان می‌دهد. بعد از تست نهایی این ۲۸ مارکر بر روی بالک‌های مقاوم و حساس به PVY، ۳ نشانگر (PT30002)، (PT20165)، (PT20357) دارای بیشترین چندشکلی بر روی بالک‌های مقاوم و حساس بوده و آنها براساس انتخاب به کمک نشانگر (MAS) شناسایی و انتخاب شده و می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای SSR پیوسته به ژن مقاومت به بیماریPVY در توتون مدنظر قرار گیرند (شکل ۶).



شکل ۴: محصول PCR هشت جفت آغازگر SSR دارای چندشکلی مناسب روی DNA والدین

Fig. 4: PCR products of eight SSR primer pairs have the highest polymorphisms on parental DNA

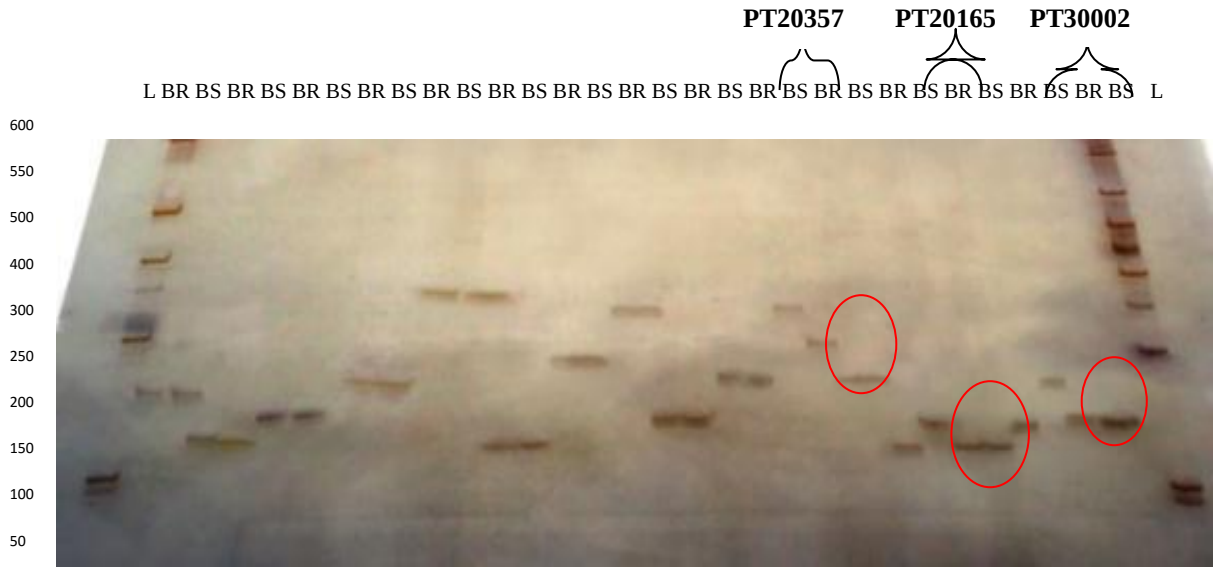


شکل ۵: الگوی نواربندی محصولات PCR تکثیر شده در نتاج F2 توسط آغازگر PT20357

Fig. 5: View of polymorphic pattern of PCR products in the F2 population with PT20357 primer

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶: الگوی چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره دارای بیشترین چندشکلی بر روی بالک‌های مقاوم و حساس به PVY. (BR بالک مقاوم و BS: بالک حساس و L مربوط به DNA Ladder می‌باشد). نشانگرهای دارای بیشترین چندشکلی با دایره مشخص شده‌اند

Fig. 6: The pattern of Microsatellite markers polymorphism on the resistant and susceptible bulk to PVY. (BR: Resistant Bulk, BS: Susceptible Bulk, L: DNA Ladder). Markers with most polymorphism marked with circles

جدول۱: نام، توالی، اندازه و دمای اتصال ۲۸ آغازگر انتخابی SSR دارای بیشترین چندشکلی بر روی DNA والدین (نشانگرهای دارای * به‌عنوان برتر نهایی در این مطالعه انتخاب شدند)

Table 1: The name, sequence, size and annealing temperature for 28 selective SSR markers with highest polymorphism

آغازگر Primer	توالی برگشت Reverse sequence	توالی رفت Forward sequence	اندازه آلل Allele size (bp)	تعداد آلل‌ها Allele number	دمای اتصال (°C) Annealing temprature
PT 1193	5,-CCTGTAACATCTGAGTGCC-3,	5,-CCATAAGTCCAACAACATGC-3,	100	1	56
PT 30170	5,-TTTAAGCTCATTGAGCCG-3,	5,-TTTAAGCTCATTGAGCCG-3,	130	1	64
PT20165*	5,-GGAATGGAGGATCTTCGT-3,	5,-TGTCTCGTGAAGCATGAA-3,	120-125	2	52
PT20172	5,-CCAAATGGTTCACTGGA-3,	5,-ACACCTCCTTCTTTGC-3,	200	1	52
PT20275	5,-GTTCTATTGATCGCCAT-3,	5,-AACAGCACCCAGCATT-3,	180-185	2	52
PT30067	5,-ATTCGCACCACTTAATCC-3,	5,-AAGCCTGGTCAGTTATCCA-3,	110	1	56
PT30338	5,-TCCATTGCAGACATAATCC-3,	5,-CCTTATTACCTCAGATACAA-3,	200	1	60
PT20445	5,-CAAGACATGTGTCAACTGAA-3,	5,-ATGGCAAATGTTGCATCTC-3,	140-150	2	60
PT30005	5,-CCCTGAGACTCAGATTC-3,	5,-TTTCACAGGCTTAAG-3,	220	1	52
PT30002*	5,-TGCGATGAATATCGAGGTGA-3,	5,-CCATTCTCCACAAGTCAA-3,	250	1	56
PT30028	5,-GCACATGCGATCTTGATT-3,	5,-AAACTTGAAGCAGAGACGG-3,	120-130	2	60
PT20357*	5,-CCGAGCAAGCTATTTGAAT-3,	5,-GGGTTGTAATGGTGCTGGA-3,	125	1	59
PT30087	5,-CTTCTAAGCCGAGGT-3,	5,-TTGATGATAGACGAAG-3,	230-240	2	60
PT30144	5,-TTGTTAGTTACCCTATTGACTT-3,	5,-TGATTGTATTGACAGCGTAC-3,	300	1	63
PT30156	5,-GGATGAACAGACAGGGACA-3,	5,-GGCAACTTCTTCTTGGCA-3,	250	1	60
PT30388	5,-TCCATTGCAGACATAATCC-3,	5,-CCTTATTACCTCAGATACAA-3,	320	1	60
PT30215	5,-TGGTCAGAGTTGTTCCTGC-3,	5,-GCAGACTGGTAGATCGCAC-3,	105-115	2	60
PT30355	5,-TCCGGATCATACATTGTTGG-3,	5,-AAGCAGAGCATTAGATGGA-3,	135	1	60
PT30184	5,-CCCATTCCTTGTTCTA-3,	5,-TTTCCTCATGCATACCAAT-3,	145	1	60
PT30378	5,-TGCAATGGCTACACAAGAAG-3,	5,-TCAATGAGGGTTGTAGCCA-3,	120-140	2	58
PT30391	5,-TCCGGTCGTGAAATCTGT-3,	5,-TGTTAAGGTATCATGTCGAT-3,	180	1	63
PT30468	5,-GGCTTAAGCACAAGCAGA-3,	5,-AATATTGTGCTTGTGTAGGT-3,	200	1	61
PT30480	5,-TAGGCGAGATTGTGAATC-3,	5,-AAAGGAACATGGACATTG-3,	120-140	2	56
PT40009	5,-CCCAAATTATCACGCAAC-3,	5,-GGTCACCTGCTCTCGAG-3,	150	1	60
PT30259	5,-GATTACCTTCAATGCCGA-3,	5,-CAGCCAAGAGAACCTTCAG-,3	180-190	2	60
PT1194	5,-GAGTCCAATGACGAACG-3,	5,-CTAATCACATGGACGAC-3,	220	1	52
PT1085	5,-TGGCAACACCTCAGGCTA-3,	5,-AGCATGTTTGTCCGGTGCT-3,	150	1	59
PT30314	5,-GCAGACCCAGGATGTGTA-3,	5,-TTGAGACATACAAGCGCA-3,	125-130	2	60

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نشانگرهای مولکولی ابزار ارزشمندی برای به‌نژادی گیاهان و به‌ویژه شناسایی ژرم‌پلاسم و انتخاب غیرمستقیم ژن‌ها هستند *نقوی* و همکاران (2005). در این پژوهش، تعداد زیادی از آلل‌ها برای هر یک از نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه روی ژل آکریل‌آمید ۶ درصد مشاهده گردید که این امر ضرورت استفاده از این ژل را برای جداسازی و تشخیص آلل‌های مختلف اثبات می‌کند. ژل پلی‌آکریل‌آمید به‌دلیل داشتن قدرت تفکیک و دقت خیلی بالا، برای تفکیک نتایج حاصل از PCR آغازگرهای SSR بسیار مناسب می‌باشد. ۱۰۰ جفت آغازگر مورد بررسی تکثیر شده در این تحقیق، در مجموع ۱۳۵ آلل با میانگین یک آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره تولید کردند. به‌طورکلی، اندازه قطعات تکثیر یافته با این آغازگرها در حد ۵ تا۵۰ جفت باز تفاوت دارند. دلیل تفاوت در اندازه قطعات تکثیر یافته می‌تواند در اختلاف تعداد تکرارهای توالی‌های موجود در آلل‌های مختلف جایگاه اتصال هر آغازگر باشد. چنین تفاوتی در اندازه قطعات تکثیر یافته نیز پیش‌تر در رابطه با توالی‌های تکراری ساده‌ای که در تحقیق *بابیکر* و همکاران (Babiker *et al.*, 2009) با استفاده از نشانگرهای SSR بر روی ارقام گندم برای شناسایی ژن مقاومت به بیماری زنگ زرد گندم (ژن *Sr35*) انجام شده بود، دیده شد که در آن تحقیق، اندازه قطعات تکثیر شده با آغازگرهای SSR در حد ۱۰ تا ۳۰ جفت‌باز بود، درحالی‌که در تحقیقی که *جینگویان* و همکاران (Jingyuan *et al.*, 2009) با استفاده از آغازگرهای SSR برای شناسایی ژن مقاومت به بیماری CMV در خیار انجام دادند، اندازه قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای SSR به هم نزدیک‌تر بوده و در حد ۱۰ تا ۲۰ جفت باز تفاوت داشتند. در پژوهش کنونی، تعداد آلل‌های شناسایی شده در هر مکان ژنی بین ۱ تا ۲ آلل بود و اکثر مکان‌های ژنی SSR به‌طور میانگین دارای یک آلل در هر مکان ژنی بودند. بررسی نتایج حاصل از پژوهش‌های محققین دیگر در مورد تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر در جایگاه نشانگرهای ریزماهواره در گیاهان دیگر بسیار متفاوت با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بود. در تحقیقی که *بیندلر* و همکاران (Bindler *et al.*, 2007) بر روی ارقام توتون با استفاده از آغازگرهای SSR انجام داده بودند، میانگین تعداد آلل در هر مکان ژنی ریزماهواره بین ۲ تا ۳ آلل بود و نیز در تحقیقی که *سلبی توپراک* و همکاران (Celebi Toprak *et al.*, 2009) برای شناسایی گوجه‌فرنگی‌های مقاوم به‌نژاد PVYo با استفاده از مارکرهای ریزماهواره (SSR) انجام داده بودند، میانگین تعداد آلل در هر مکان ژنی بین ۲ تا ۴ آلل بود. تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به‌دلیل منشأ و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری باشد. در تحقیق حاضر، برای ایجاد بالک (توده)های مقاوم، از برگ‌های ۱۰ بوته F2 مقاوم به PVY استفاده شد و همین کار با استفاده از برگ‌های ۱۰ بوته F2 حساس به PVY برای تشکیل بالک (توده) حساس انجام گرفت. انتخاب ۱۰ بوته برای تشکیل بالک (توده) مقاوم و حساس به بیماری PVY به این دلیل مناسب بوده که *ژو* و همکاران (Zhu *et al.*, 2006) در نتیجه مطالعات خود بیان کردند که مخلوط کردن تعداد زیادی از افراد نسل‌های در حال تفرق برای ساخت بالک (توده)، باعث کاهش احتمال مشاهده تفاوت بیم دو توده برای نواحی غیر از نواحی مجاور ژن هدف می‌گردد. در پژوهش حاضر، عده‌ای از نشانگرها باندهای بسیار کمرنگ و نامناسب تکثیر کردند که دلیل آن می‌تواند به‌علت نداشتن محل اتصال مناسب برای این آغازگرها، داشتن فقط یک محل اتصال یا زیاد بودن فاصله محل‌های اتصال متوالی بر روی ژنوم گیاه توتون باشد. همچنین بهتر بودن کیفیت تکثیر و ایجاد باندهای واضح‌تر توسط بعضی از آغازگرها ممکن است ناشی از بیشتر بودن شباهت توالی این آغازگرها با ژنوم گیاه توتون باشد *داوالیوا* و همکاران (Davalieva *et al.*, 2010). در تحقیقی که *ژانگ* و *رودال* (Xiong and Rodal, 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 می‌شود، 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 نام‌های Va و Va2 کنترل می‌شود. از آن‌جایی‌که هنوز تاکنون ارزیابی دقیق مزرعه‌ای و بررسی پلی‌مورفیسم مولکولی ارقام مقاوم و حساس توتون به بیماریPVY توسط نشانگرهای SSR انجام نشده بود، در پژوهش حاضر این کار انجام شد و از روش انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای شناسایی نشانگرهای پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون استفاده شد. این روش در کنار ارزیابی چندشکلی والدین و همچنین ارزیابی چندشکلی بالک‌های مقاوم و حساس به PVY یک راهبرد کارآ برای تسهیل ژن‌های مقاومت به‌شمار می‌رود، زیرا در مقایسه با تعیین ژنوتیپ جمعیت با تعداد زیادی از نشانگرها، موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌شود. *هررا* و همکاران (Herrera *et al.*, 2007) بیان کردند که یکی از مهم‌ترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی در دهه‌های اخیر، ارزیابی پتانسیل ذخایر توارثی است که از میان نشانگرها،

www.SID.ir

Archive of SID

نشانگرهای ریزماهواره (SSR) نشانگرهای مولکولی قابل اعتماد، کم‌هزینه، آسان، هم‌بارز و فراوانند و میزان چندشکلی زیادی دارند، درجه بالایی از تنوع آللی را نشان می‌دهند و برای گزینش به کمک نشانگر (MAS) نشانگرهای بسیار مناسب و ایده‌آل هستند. ژو و همکاران (2006) اظهار داشتند که با استفاده از نشانگرهای هم‌بارز همانند نشانگرهای SSR، گزینش به کمک نشانگر در نسل F2 برای مقاومت به بیماری PVY در توتون می‌تواند تأثیری مشابه با این عمل در نسل‌های پیشرفته‌تر داشته باشد. بنابراین از طریق گزینش به کمک نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت در نسل‌های اولیه و گزینش افراد هموزیگوت دارای آلل نشانگر والد مقاوم می‌توان عملیات اصلاحی را تسریع کرده و کارآیی گزینش را افزایش داد. در آنالیز نهایی این تحقیق مشخص گردید که از ۱۰۰ جفت آغازگر SSR توتون مورد استفاده، در نهایت ۳ نشانگر SSR به نام‌های (PT30002)، (PT20165)، (PT20357) شناسایی شدند که بر روی بالک‌های مقاوم و حساس توتون به بیماری PVY هم دارای بیشترین پلی‌مورفیسم بودند. این ۳ نشانگر می‌توانند برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت به بیماری PVY در توتون و در نهایت برای تولید ارقام اصلاحی توتون مقاوم به بیماری PVY به‌کار گرفته شوند. در پایان پیشنهاد می‌گردد برای اینکه بتوان نتایج دقیق‌تری از این مطالعه به‌دست آورد، از نشانگرهای SSR بیشتر جهت تکثیر ژنوتیپ‌های فوق استفاده شده و نیز پیوستگی ژنتیکی دقیق این نشانگرها و فاصله آنها با ژن مقاومت به PVY با نرم‌افزارهای آماری مربوطه انجام گردد.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش به خاطر راهنمایی‌ها و فراهم کردن امکانات اجرای این تحقیق قدردانی می‌گردد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۵-۲۶ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir