مجله زارعت و اصلاح نباتات
جلد ۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحات ۶-۱

ریزازدیادی و انتخاب کلونهای کشت بافت چغندر قند برای مقاومت به ریزومانیا از طریق آزمون الایزا

Micromultiplication and selection of culture clones of sugar beet texture for resistance to rhizomania through ELIZA test

قاسم رضاعلی[۱]، یمان نوروزی[۲]، دانیال کهریزی[۳]

چکیده

در این تحقیق به منظور غربال ژنوتیپ های مقاوم به ریزومانیا، از کلون های حاصل از کشت بافت چغندر قند استفاده گردید. برای این کار، ابتدا ریز نمونه نقاط انتهایی ساقه گلدهنده چغندر قند پس از ضدعفونی سطحی به محیط رشد جوانه رویشی منتقل گردید. سپس جوانه های رشد کرده به محیط های کشت حاوی ترکیبات مختلف هورمونی *IBA, BA,NAA* و *GA3* جهت تکثیر، رشد و ریشه زائی جوانه منتقل شدند. کلونهای حاصل سپس به خاک انتقال داده شده و به شرایط محیطی گلخانه سازگار شدند. برای آزمایش تلقیح کلونها به منظور غربال آنها نسبت به بیماری ریزومانیا، تعدادی ژنوتیپ از کلون های سازگار شده انتخاب و با خاک آلوده به بیماری ریزومانیا تلقیح شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با تکرارهای نامساوی اجرا گردید. برای این کار، گیاهان سازگار شده از گلدان ها خارج شده و در گلدان جدید حاوی ماسه و خاک آلوده به ریزومانیا به نسبت ۳:۷ منتقل گردیدند. پس از ۶ هفته از شروع تلقیح با خاک آلوده، به منظور تشخیص آلودگی ارقام به ویروس عامل بیماری و نیز تعیین میزان آلودگی، آزمون الایزا به کار گرفته شد. این آزمون به روش مستقیم(*DAS- ELISA*) انجام شد و اعداد قرائت شده الایزا به وسیله نرم افزار *SAS* مورد تجزیه آماری قر ار گرفتند. بین ژنوتیپ ها تفاوت معنی دار مشاهده گردید. درمقایسه میانگین، به روش دانکن با نرم افزار *SAS* ونیز گروه بندی با نرم افزار *SPSS* ژنوتیپ ها دامنه ای ازحساسیت کامل تا مقاومت به ریزومانیا را نشان دادند، با توجه به آنکه در این تحقیق. از کلون های مشابه ژنتیکی به عنوان تکرارهای درون هر تیمار(ژنوتیپ) استفاده گردید بنابراین اختلافات درون ژنوتیپی صرفا محیطی است و در نتیجه اختلافات بین ژنوتیپ ها و نهایتا انتخاب بهترین ژنوتیپ با دقت بیشتری برآورد می گردد.

واژه های کلیدی: ریزومانیا، کلون کشت بافت، الایزا، چغندر قند

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه،گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرمانشاه،ایران
۲- موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، کرج، ایران
۳- دانشگاه رازی،گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرمانشاه، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

در حال حاضر ریزومانیا (Rhizomania) از مهم ترین و مخرب ترین بیماری های چغندر قند محسوب می شود که خسارت آن معمولاً بیش از ۳۰ درصد و در مواردی به ۹۰ تا ۱۰۰درصد در ارقام حساس می رسد (Asher 1993 , Valkonen 2005). به طوری که آلودگی شدید مزرعه، منجر به کاهش عملکرد به میزان ۵۰ درصد یا بیشتر شده و درصد قند می تواند از ۱۸-۱۶ درصد به کمتر از ۱۰ درصد کاهش یابد(Johnsson ,1985). بیماری ریزومانیا در اغلب مناطق چغندر کاری اروپا، آسیا و آمریکا گزارش شده است(Hoeing , lennefors 2000). در ایران هم در سال ۱۳۷۴ وجود این بیماری در مزارع چغندر قند استان فارس مشاهده و تا کنون از اکثر نقاط چغندر کاری کشور گزارش گردیده است (ایزدپناه و همکاران ۱۳۷۵).

عامل این بیماری، ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند (Beet Necrotic Yellow Vein Virus) BNYVV می باشد که توسط قارچ خاکزاد پلی میکزا (Polymyxa betae keskin) به چغندرقند منتقل می گردد (Tamada 1973-1975). نظر به اینکه کنترل بیماری به روش های زراعی، شیمیایی و بیولوژی چه از نظر اقتصادی و چه از نظر زیست محیطی و اجتماعی موثر نبوده و شدنی نیست از این رو اصلاح ارقام مقاوم به ریزومانیا از طریق برنامه های اصلاح نباتات کلاسیک و روش های پیشرفته مهندسی ژنتیک لازم می نماید. به کارگیری کلون های حاصل از کشت بافت در اصلاح گرده افشان ها در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است. از آنجایی که در تهیه ارقام مقاوم به بیماری ها از جمله ریزومانیا نیاز است که ژنوتیپ های مقاوم ابتدا شناسایی گردند و سپس در تلاقی های مربوطه شرکت نمایند لذا در این تحقیق پس از تهیه و تکثیر کلون های حاصل از کشت بافت در گیاه چغندرقند با استفاده از روش های ارزیابی گلخانه ای، ابتدا کلون های سازگار شده به شرایط گلخانه با خاک آلوده به ریزومانیا تلقیح شده و سپس با استفاده از آزمون الایزا، غلظت ویروس در نمونه های گیاهی اندازه گیری خواهد شد و بدین ترتیب ژنوتیپ های مقاوم شناسایی خواهند شد. در ادامه با حفظ و تکثیر کلون های مقاوم و استفاده از آنها در مراحل اصلاحی چغندر قند منجر به تولید رقم مقاوم به ریزومانیا می شود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش ساقه های گلدهنده چغندر قند بود که دارای والدین مقاوم نسبت به ریزومانیا می باشند. این ساقه های گلدهنده به روش مرسوم آزمایشگاه کشت بافت ضد عفونی سطحی شده، سپس ساقه گلدهنده را به قطعات کوچک ۲ تا ۳ سانتیمتر جدا کرده و به محیط تولید و رشد جوانه رویشی BIG دارای ترکیبات هورمونی BA و IBA و GA3 به ترتیب با غلظت های ۱ و ۰/۱و ۰/۲ میلی گرم در لیتر منتقل گردیدند. به منظور تکثیر جوانه های حاصل از مرحله قبل پس از ۲ تا ۳ هفته جوانه های رشد یافته به محیط جدید BIN حاوی ترکیبات هورمونی BA, NAA و IBA به ترتیب با غلظت های ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر منتقل و پس از ۲ تا ۳ هفته گیاهچه های باز زا شده جدا شده و به محیط MB فاقد هورمون جهت رشد طولی انتقال یافتند پس از رسیدن به ارتفاع ۵ تا ۷ سانتیمتر از محیط MB جدا و در محیط ریشه زایی یا NI با ترکیبات هورمونی NAA و IBA با غلظت های ۱/۵ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر قرار داده شدند.

پایه کلیه محیط کشت های به کار رفته MS پایه (Murashing and Skoog 1962) حاوی ویتامین های محیط B_5 (Gamborg and Ojima 1968) به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیترآگار بوده و شرایط اتاقک رشد ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۴ تا ۵ هزار لوکس با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد بوده است. پس از ریشه دار شدن، گیاهچه و به گلدان های ۷ سانتی متری با نسبت ۱:۱ خاک استریل و پیت ماس انتقال و با محلول هوگلند (Hoagland and Arnon 1950) آبیاری گردیدند و مراحل سازگاری با شرایط محیطی را طی کردند. با این روند از هر کلون به تعداد تکثیر و از آنها گیاه سازگار و رشد یافته

Archive of SID

www.SID.ir

در گلخانه تهیه شد سپس ۱۱ ژنوتیپ از این کلون ها که هر کدام حاصل از یک ساقه گلدهنده بودند به تعداد مورد نیاز به تصادف انتخاب و در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل اجرا گردید. به این صورت که گیاهان از گلدانها خارج و پس از شستشوی ریشه ها به خاک آلوده به ریزومانیا با نسبت ۳:۷ به ترتیب ماسه استریل و خاک آلوده منتقل و پس از ۶ هفته از زمان تلقیح ریشه های گیاهان را خارج کرده و پس از شستشو در پاکت های مجزا در ۲۰°c- نگهداری گردیدند. بعد از هرنمونه ۰/۱ گرم ریشه توزین و در ۱/۵ میلی گرم بافر عصاره گیری الایزا با دستگاه له کن له شده و روند آزمون الایزا به روش DAS-ELISA انجام گرفت.در هر پلیت چند نمونه گیاه سالم و یک نمونه گیاه آلوده به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده گردید سپس مقادیر جذب الایزا در ۴۰۵ نانومتر بوسیله دستگاه الایزا قرائت گردید. داده های الایزا پس از تبدیل به ln(OD×20) نرمال گردیده و در ادامه آنالیز داده ها روی داده های تبدیلی به روش تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی نا متعادل (جدول ۱) شامل ۱۱ تیمار(همان ژنوتیپ های مورد بررسی نامعلوم برای آزمون مقاومت) و مقایسات میانگین دانکن در سطح احتمال ۱ درصد روی داده ها با نرم افزار SAS و گروه بندی ژنوتیپ ها توسط برنامه SPSS انجام گرفت.

نتایج و بحث

با توجه به تفاوت شدت واکنش الایزا در تست های مختلف و لزوم داشتن یک معیار برای تشخیص نمونه آلوده از نمونه سالم، هیل و جکسون فرمولی برای محاسبه حد آلودگی ارائه دادند به این صورت که $R = \overline{X} + 3SD$ که در آن R: حد آلودگی، $\overline{X}$: میانگین جذب نور مربوط به چاهکهای شاهد منفی و SD: انحراف معیار میزان جذب نور در چاهکهای شاهد منفی است (Hill and Jackson,1984). طبق این فرمول آستانه آلودگی در این تحقیق ۰/۱۲۱ محاسبه گردید یعنی ژنوتیپ هایی که میانگین جذب کمتر از این حد را دارند کاملاً سالم وجزء ژنوتیپ های مقاوم،می باشند. آنالیزی که روی مقادیر جذب الایزا انجام شد اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد بین ژنوتیپ ها را نشان داد. که مورد انتظار بود. اختلاف بین کلون های درون هر زنوتیپ ناشی از اثرات محیطی است زیرا کلون های هر ژنوتیپ که از طریق تکثیر غیرجنسی کشت بافت به دست آمده اند دارای یک ژنوتیپ می باشند. در نتیجه اختلافات بین کلون های درون هر ژنوتیپ ناشی از اثرات محیطی است که در اثر شرایط تلقیح با خاک آلوده، زمان انتقال و شرایط محیطی تکرار های مختلف و خطاهای آزمایشی در روند انجام آزمون الایزا می تواند باشد. با این حال روند غربال ژنوتیپ ها از دقت بسیار بالایی برخوردار بود زیرا از هر ژنوتیپ چندین تکرار همسان ژنتیکی وجود داشته است که با خاک آلوده تلقیح و میزان مقاومت آن به صورت کمی مورد بررسی قرار گرفته است. جدول ۲، مقایسات میانگین ها بر اساس روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد را نشان می دهد. میانگین داده های الایزای ژنوتیپها ، به گروههای مختلف تقسیم بندی شدند که اختلاف در سطح احتمال یک درصد طیفی از گروه بندی ها را از حساس تا مقاوم در بین ژنوتیپها مشخص می نماید. همچنین در مطالعات امیری و همکاران، لولن و همکاران (Lewellen, 1995) حدی بین گیاهان حساس تا مقاوم تعیین گردید که دو برابر میانگین جذب شاهد منفی می باشد. و ژنوتیپ هایی که در این آستانه قرار می گیرند جزء ژنوتیپ های متحمل قرار داده شدند زیرا طیفی از مقاومت را نشان می دهند.

طبق جدول ۲ ژنوتیپ های گروه A جزء ژنوتیپ های کاملاً حساس قرار گرفته، B نیمه حساس، C نیمه متحمل، D متحمل و ژنوتیپ های گروه E جزء ژنوتیپ های کاملاً مقاوم قرار گرفتند. پس در این تحقیق ژنوتیپ SP-۷ کاملا مقاوم و ژنوتیپ های , SP-8, SP-10 , SP-1 SP-5 با سطحی از مقاومت به عنوان متحمل و بقیه جزء ژنوتیپ ها نیمه حساس و کاملاً حساس قرار می گیرند نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن و مقایسه آن با نتایج تجزیه کلاستر(نمودار ۱) نشان می دهد که ژنوتیپ های SP- SP-1,SP-3,SP-4,SP-5,SP-8

Archive of SID

www.SID.ir

9،SP-10 مقاوم به بیماری ریزومانیا و ژنوتیپ های SP-11,SP-6,SP-2 حساس به بیماری ریزومانیا و ژنوتیپ SP-7 کاملاً مقاوم می باشند. نتایج این تحقیق با توجه به دیپلوید بودن ژنوتیپ ها، طیف وسیعی از مقادیر جذب الایزا در ژنوتیپ های مختلف دیده شد که می تواند به علت داشتن تعداد متفاوتی از آلکهای مقاومت یا اثر دز ژنی بوده که مطابق با نتایج امیری و همکاران(۲)، لولن و همکاران(۹) می باشد. با استفاده از روش تهیه کلون به علت یکسان بودن ژنوتیپ ها در هر کلون و تکرار آن از خطای حاصل از فرار از عامل تلقیح کاسته شده و غربال با دقت بیشتری نسبت به روش های مرسوم آزمایشگاهی اعمال می گردد.

جدول۱- تجزیه واریانس داده های الایزا در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرارهای نا مساوی

Table 1. Analysis of variance of ELISA data in completely randomized design with in equal replicates

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات M.S
تیمار Trentrent	۱۰	۱/**۵۶
خطا Error	۵۶	۰/۰۳۳
کل Total	۶۶	------
**معنی دار در سطح ۰/۰۱ Significant at 0.01 level	------	۱۹ CV=۷٪

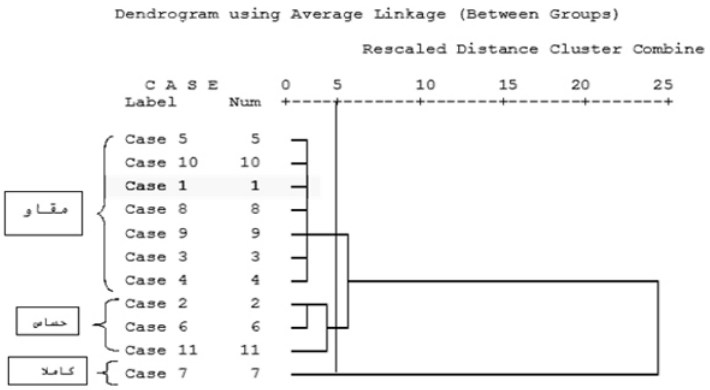
جدول۲- مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ و گروهبندی ژنوتیپ ها از نظر مقاومت به بیماری ریزومانیا

Table 2. Mean Comparison by Duncans method at 0.01 probability level and genotypes classification for resistance to rhizomania disease

مقایسه میانگینها به روش دانکن در سطح احتمال ۱ درصد Comparison by duncken method surface 0/01				
نام ژنوتیپ name of genotype	تعداد نمونه Number of samples	میانگین ژنوتیپ Mean genotype	گروهبندی بر اساس معیار $R=\overline{X}+3SD$	گروه بندی براساس روش دانکن Grouping base on Duncan method
Sp_{1-d}	۴	۰/۱۱۰	*مقاوم*	متحمل
Sp_{2-b}	۳	۰/۲۴	*حساس*	نیمه حساس
$Sp_{3—c}$	۵	۰/۱۵۱	*متحمل*	نیمه متحمل
Sp_{4-c}	۶	۰/۱۵۸	*متحمل*	نیمه متحمل
Sp_{5-d}	۶	۰/۱۰۸	*مقاوم*	متحمل
Sp_{6-b}	۶	۰/۲۶۷	*حساس*	نیمه حساس
Sp_{7-e}	۱۰	۰/۰۷۳	*مقاوم*	کاملامقاوم
Sp_{8-d}	۱۰	۰/۰۹۹	*مقاوم*	متحمل
Sp_{9-de}	۸	۰/۰۸۶	*مقاوم*	نیمه مقاوم
Sp_{10-d}	۴	۰/۱۰۸	*مقاوم*	متحمل
Sp_{11-a}	۱۵	۰/۳۷۱	*حساس*	کاملاحساس
آستانه آلودگی	$R=\overline{X}+3SD$	۰/۱۲۱		
	$2\overline{X}$	۰/۱۸۰		
	$3\overline{X}$	۰/۲۷۰		

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱- دندرو گرام تجزیه خوشه ای

Table1- Cluster analysis dendrogram

سپاسگزاری:

بدین وسیله از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج که هزینه های طرح را تقبل کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم. همچنین از آقای دکتر محمودی و خانم مهندس کاکوئی نژاد که در آزمون های الایزا اینجانب را یاری نموده اند کمال تشکر می گردد.

شکل ۱-اتاقک رشد جهت کنترل شرایط نوری و دمایی برای رشد بهینه ریزنمونه ها

Fig1- Growth room for control of light and temperature conditions for optimal growth of microsamples.

شکل ۲- گیاه کشت بافتی ریشه دار شده چغندر قند در محیط IN آماده انتقال به گلدان ۱۰۰ گرمی

Fig 2- Fibrous tissue culture plant of sugar beet in NI environment, ready for transfer to 100- gram vase.

شکل ۳-انتقال گیاهان ریشه دار یا فاقد ریشه چغندر قند از محیط کشت به گلدان های ۱۰۰گرمی

Fig 3- Transfer of fibrous or root-less plants of sugar beet from culture environment to 100- gram vase.

Archive of SID
www.SID.ir

References **فهرست منابع**

ایزدپناه، ک.، هاشمی، پ.، کامران، ر.، پاک نیت، م.، سهند پور، آ. و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریزومانیا (شبه Rhizomania) در فارس. مجله بیماری های گیاهی،جلد ۳۲،صفحات ۲۰۶-۲۰۰.

R. Amir.,M. Moghaddam.,M. Mesbah.,S.Y. Sadeghian.,M.R. Ghannadha,. & k. Izadpanah, 2003a. 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.

M.J.C., Asher . 1993. Rhizomania. Pages 311-346 in: The Sugar Beet Crop: Science into Practice. D. A. Cooke and R. K. Scott, eds. Chapmann and Hall, London.

O.L .,Gamborg ,R.A. Miler, And K.Ojima, 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell Res, 50: 151-158.

S.A. Hill, and E.A. Jackson, 1984. An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leaf roll virus and potato virus Y in tubers. Plant Pathology, 33: 21-26.

D.R. Hoagland, & D. I. Arnon. 1950. The water_ Culture Method for Growing plants without soil. California Experiment Station Circ. 32-347.

E. Johnsson, 1985. Rhizomania in sugar beet-A threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. Sveriges Utsadesforenings Tidskrift. 95:115-121.

R. Koeing, & B.L. Lennefors, 2000. Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. Arch. Virol. 145: 1561-1570.

Archive of SID

www.SID.ir