مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره اول، شماره چهارم، پاییز ۱۳۹۰

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

انتخاب ژنوتیپ های هموزیگوت غالب مقاوم به ریزومانیا در ژرم پلاسم چغندرقند با استفاده از نشانگر ناجفت PN3

رامین فلاح زاده[۱]، پیمان نوروزی[۲]، آباذر رجبی[۳]، محمد علی ابراهیمی[۴*]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور
[۲] استادیار، بخش تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند
[۳] استادیار، بخش تحقیقات به نژادی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند
[۴] استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مهم ترین بیماری های چغندرقند، بیماری ریزومانیا بوده که حتی قادر به خسارت کلی به محصول این گیاه می باشد. تنها راه حفاظت محصول این گیاه مهم زراعی در مزرعهٔ آلوده به ریزومانیا، کشت ارقام مقاوم است.

مواد و روش ها: در این تحقیق از یک نشانگر مولکولی ناجفت (RAPD)، موسوم به PN3، پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا برای شناسائی تک بوته های هموزیگوت غالب مقاوم در ۲۸ ژنوتیپ چغندرقند شامل پنج توده S1، ۱۶ لاین اوتایپ، دو لاین گرده افشان و پنج هیبرید، مجموعا مشتمل بر ۱۵۵۱ تک بوته کشت شده در مزرعه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج در سال زراعی ۹۰-۸۹ استفاده شد. پس از نمونه برداری برگ از گیاهان مزرعه ای، اقدام به استخراج DNA ژنومی گردید. آزمون RAPD-PCR بر روی نمونه های گیاهی با آغازگرهای مربوطه انجام گرفت و سپس بر اساس نشانگر، درصد بوته های هموزیگوت غالب در قالب طرح کاملا تصادفی نامتعادل مورد تجزیه واریانس قرار گرفت.

یافته ها: بین کلیه ژنوتیپ ها اختلاف معنی داری از نظر صفت درصد بوته های هموزیگوت غالب وجود دارد. مقایسه میانگین داده ها، نشان داد که ژنوتیپ های اوتایپ ۵، ۱۱ و ۱۲ بیشترین درصد بوته های هموزیگوت غالب را دارند. تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها بر مبنای درصد حضور بوته های هموزیگوت غالب انجام و ژنوتیپ ها در چهار گروه مجزا تفکیک شدند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق حاکی از امکان بهره برداری کارآمد از نشانگر مولکولی PN3 در مراحل انتخاب، جهت ارزیابی سریع ژرم پلاسم های چغندرقند گیاهان مقاوم در طی فرایند تهیه رقم می باشد.

کلمات کلیدی: چغندرقند، نشانگر PN3، ریزومانیا، نشانگر RAPD

مقدمه

چغندرقند یکی از دو محصول مهم تأمین کنندهٔ قند در جهان می باشد. مهم ترین بیماری که گیاه چغندرقند را تهدید می کند ریزومانیا می باشد که زراعت این گیاه را مختل نموده است. این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۵ توسط ایزدپناه و همکاران از فارس گزارش شد (ایزد پناه و همکاران، ۱۳۷۵). متعاقب آن، بیماری از اکثر مناطق چغندرکاری کشور گزارش گردید (توده فلاح و همکاران، ۱۳۷۹). عمدتا دو ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند شناسایی شده اند که از منابع مختلف منشأ گرفته اند و بصورت Rz1 و Rz2 نامگذاری شده اند (Scholten and Lange., 2000). برای ارزیابی صحیح نتاج در روش های مختلف اصلاح چغندرقند برای مقاومت به ریزومانیا، نیاز به شناسایی صحیح گیاهان مقاوم است. از روش تجزیه تفرق توده (BSA)[1]

آدرس نویسنده مسئول: گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور.
Email: ebrahimi_mpn@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۶/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۰۲

1-Bulk segregant Analysis

Archive of SID
www.SID.ir

برای شناسایی نشانگرهای RAPD[1] پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در منبع زراعی این مقاومت به نام Holly (برگرفته از نام موسسه تحقیقات چغندرقند امریکایی هولی) در گیاه چغندرقند استفاده نمودند (Pelsy and Merdinoglu., 1996). از ۱۶۰ آغازگر استفاده شده، ۱۹ آغازگر، ۴۴ نشانگر چند شکلی تولید نمودند که در ۹ گروه پیوستگی طبقه بندی شدند. با استفاده از تجزیه واریانس، ۱۲ نشانگر چند شکل، دارای اثرات معنی داری بر روی سطح مقاومت بودند. در نهایت یک QTL[2] برای مقاومت، گزارش شد که ۴/۶۷ درصد از تنوع مشاهده شده را توجیه می نمود. نتایج مطالعه این محققین نشان داد که QTL شناسایی شده متناظر با یک ژن بزرگ اثر مقاومت در منبع زراعی وجود دارد. (Scholten et al., 1999) از روش تجزیه تفرق توده برای شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته با ژن های مقاومت به BNYVV[3] در خانواده های در حال تفکیک چغندرقند استفاده نمودند. نسبت های تفکیک مشاهده شده گیاهان مقاوم به حساس در خانواده های Holly–1–4 و R128 نشان دهنده وجود یک ژن بزرگ اثر غالب برای مقاومت به ویروس BNYVV بود. (Giorio et al., 1997) با استفاده از روش تجزیه تفرق توده بر روی هیبرید تری وی کراس گلف (Golf) ژنی را برای مقاومت به ریزومانیا شناسایی نمودند. آن ها با مقایسه یافته های خود با نتایج (Barzen et al., 1997) دریافتند که نشانگرهای پیوسته با ژن مقاومت در منبع زراعی با ژن مقاومت گلف نیز پیوسته بودند. این نتایج نشان داد که ژن مقاومت موجود در هیبرید گلف می تواند همان ژن مقاومت در منبع زراعی باشد. (Scholten et al., 1997,1999)، نام Rz۱ را برای ژن منبع زراعی مقاومت (هولی) و نام Rz۲ را برای ژن (های) منبع وحشی مقاومت (WB۴۲) پیشنهاد نمودند. Amiri گزارش نمود که مقاومت در منبع وحشی با یک ژن غالب (Rz۲) کنترل می شود و فاصله آن از ژن Rz۱ در منبع زراعی حدود ۳۵ سانتی مورگان می باشد (Amiri et al., 2003a). با بررسی وراثت مقاومت به بیماری ریزومانیای چغندرقند دریافتند که ژن های مقاومت در منابع زراعی و وحشی غیر آللی و به صورت پیوسته می باشند. در تحقیقاتی دیگری (Amiri., 2003b; Amiri et al., 2009) با استفاده از تکنیک RAPD در جمعیت F۲ حاصل از تلاقی رگه نرعقیم شماره ۲۶۱ و چغندر یک ساله با منابع مقاومت زراعی و وحشی انجام گردید، یک نشانگر ناجفت با پیوستگی شدید (با فاصله ۶/۳ سانتی مورگان) برای مکان ژنی Rz۲ حاصل از منبع وحشی و یک نشانگر جفت با پیوستگی کم برای مکان ژنی Rz۱ حاصل از منبع زراعی گزارش گردید. نوروزی و همکاران با استفاده از تکنیک RAPD موفق به شناسائی نشانگرهای R۱ و R۲ به ترتیب در فواصل ۳۲/۲ و۳/۸ سانتی مورگان از ژن Rz۱ در فاز ناجفت و نشانگرهای C۴ وC۱ به ترتیب در فواصل ۴/۲۱ و ۵/۲۷ سانتی مورگان از ژن Rz۱ در فاز جفت شد (Norouzi et al., 2008). نوروزی و همکاران با روش RAPD و روش تجزیه تفرق توده بر روی یک توده در حال تفرق F۲ توانستند یک نشانگر ناجفت AN۹ پیوسته با ژن Rz۱ در فاصله ۷/۱۳ سانتی مورگان بدست آورند (Norouzi et al., 2009). امروزه با استفاده از نشانگرهای مولکولی که نسبت به روش های فنوتیپی دقیق تر و سریع تر بوده و وابسته به فصل خاصی از سال هم برای ارزیابی نمونه های گیاهی نیستند، می توان گیاهان دارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. بنابراین نشانگرهای مولکولی می توانند ابزاری مفید برای انتخاب ژنوتیپ های مقاوم به بیماری های گیاهی به خصوص ریزومانیا باشند. این تحقیق به منظور شناسائی بوته های هموزیگوت غالب مقاوم به ریزومانیا در ژنوتیپ های مختلف چغندرقند با استفاده از نشانگر ناجفت[4] PN۳ طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و استخراج DNA: در این پژوهش، حضور نشانگر مولکولی ناجفت PN۳ حاصل از تحقیقات قبلی (نوروزی و فقهی ۱۳۸۸) بر روی DNAی استخراج شده از ۱۷۷۹ تک بوته اصلاحی از ۲۸ ژنوتیپ مختلف چغندرقند شامل پنج توده ۱۶ ،S۱۰ لاین اوتایپ (O-Type)، دو لاین گرده افشان (Pollinator) و پنج هیبرید (با کد M) بررسی گردید. بذور

1-Random Amplified Polymorphic DNA
2-Quantitative trait loci
3-Beta necrotic yellow vein virus

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه های گیاهی در مزرعه ایستگاه تحقیقاتی مهندس مطهری وابسته به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر جغندر قند کرج کشت شدپس از تهیه گیاهان یک ماهه، DNA ژنومی هر نمونه از ۰/۲ گرم بافت برگی تازه به روش (Dellaporta et al., 1992) با استفاده از بافر حاوی SDS استخراج شد. سپس DNA استخراج شده در بافر TE حل شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز مشخص شد. حضور نشانگر ناجفت PN۳ حاصل از تحقیقات (Norouzi et al., 2008) بر روی DNA استخراج شده از ۱۵۵۱ تک بوته اصلاحی از ۲۸ ژنوتیپ مختلف چغندرقند شامل پنج توده S۱، ۱۶ لاین او تایپ، دو لاین گرده افشان و پنج هیبرید بررسی گردید.

آزمون RAPD: واکنش زنجیره پلی مراز برای انجام RAPD در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش انجام گرفت. برای ایجاد شرایط مناسب واکنش PCR ابتدا غلظت مناسب نمک منیزیم، آغازگر و DNA با استفاده از آزمون شیب غلظت تعیین گردید. حجم مورد نیاز DNA در یک واکنش، ۱/۵ میکرولیتر با غلظت ۵۰ng/µl، ۲/۵ میکرولیتر buffer ۱۰x، ۲ میکرولیتر dNTP با غلظت ۲/۵ میلی مولار، ۱/۸ میکرولیتر MgCl۲ با غلظت ۲۵ میلی مولار، ۱ میکرولیتر با غلظت ۳۰ ng/µl از هر یک از دو آغازگر (توالی آغازگر مستقیم:

`3GACGTGCATC `5

و توالی آغازگر معکوس:

(`3AGCCGGTATG `5

، ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی مراز بود. واکنش زنجیره پلی مراز برای آزمون RAPD در دستگاه ترموسایکلر با مراحل زیر صورت گرفت: ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه در°C ۹۴، ۴۰ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای °C۹۴، اتصال به مدت ۴۰ ثانیه در دمای °C ۳۴، توسعه به مدت ۱ دقیقه در دمای °C۷۲ و یک مرحله ۱۰ دقیقه ای توسعه نهایی برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش در دمای °C ۷۲. سپس الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰، رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و عکس برداری در دستگاه ژل داک انجام گرفت. در نهایت الگوی نواربندی ژنوتیپ ها روی ژل مشخص شد.

محاسبات آماری: داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS V. 9.2. مورد آنالیز و تجزیه واریانس قرار گرفت. سپس مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن و تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها به روش UPGMA انجام شد. برای مقایسه نسبت مشاهده شده نشانگر با نسبت مورد انتظار مندلی در هر توده S_1 از آزمون مربع کای (χ^2) استفاده گردید.

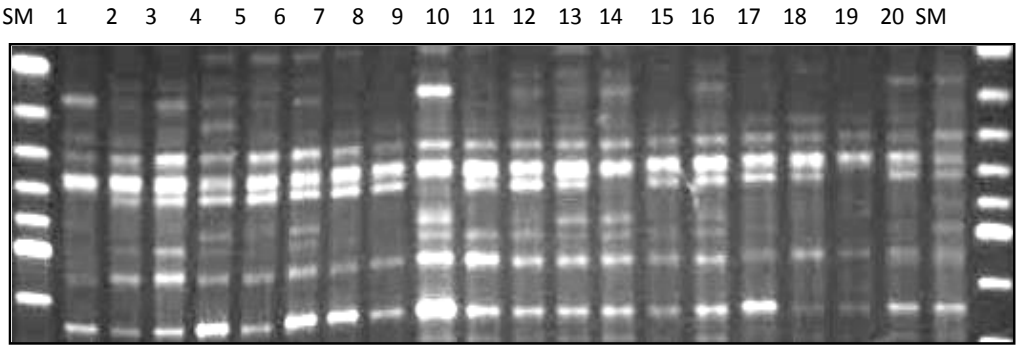
یافته ها

DNA ژنومی استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۶۰ ولت، اسمیر[1] کمی داشت. بنابراین می توان نتیجه گرفت که روش استفاده شده برای استخراج DNA از بافت برگی روشی ساده، سریع و مناسب بوده و DNA استخراج شده از کیفیت مطلوبی برخوردار است. کمیت DNA نیز برای تعدادی از تک بوته ها با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد که پس از تایید بهینه بودن شرایط استخراج به دلیل تعداد زیاد نمونه ها بسته به حجم رسوب DNA رقیق سازی در بافر TE به میزان ۲۵۰-۱۰۰ میکرولیتر انجام شد.

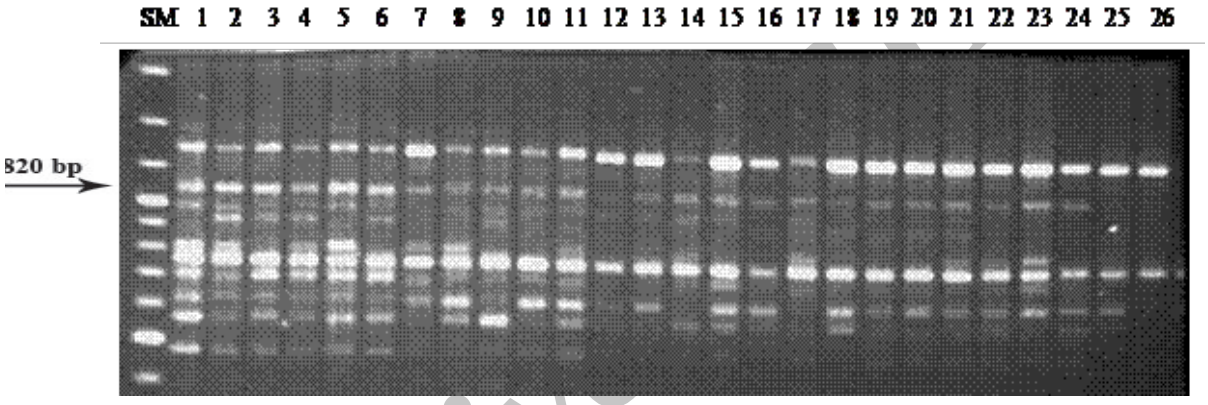
در واکنش PCR: استفاده از غلظت بالاتر از غلظت محاسبه شده برای نمک منیزیم باعث ایجاد اسمیر و استفاده در غلظت کمتر منجر به عدم تکثیر برخی قطعات در چرخه اولیه واکنش و در نتیجه از دست رفتن برخی چند شکلی های احتمالی شد. با توجه به این که نشانگر مورد استفاده از نوع ناجفت[2] می باشد و آلل حساس را شناسایی می کند، بنابر این در توده در حال تفرق برای ژن مقاومت به ریزومانیا می توان بوته های هموزیگوت غالب را که فاقد باند نشانگر ناجفت می باشند با درصد احتمال زیاد بر اساس فاصله نشانگر با ژن شناسایی نمود. نمونه ای از نتایج PCR برخی ژنوتیپ ها در شکل ۱ تا ۳ آورده شده است. در نهایت درصد بوته های هموزیگوت غالب احتمالی (بوته های فاقد نشانگر ناجفت) به تفکیک هر ژنوتیپ محاسبه شد. چون داده ها به صورت درصد جمع آوری و دارای توزیع دو جمله ای بودند و در برخی ژنوتیپ ها درصد

1 - Smear
2 -Repulsion

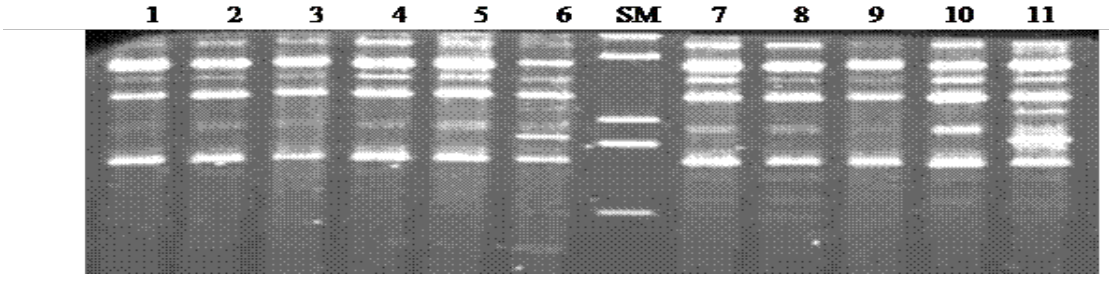
www.SID.ir



شکل۱- ژل تهیه شده از نشانگر ناجفت PN۳. SM نشانگر اندازه DNA و شماره های ۱ تا ۲۰ به ترتیب نشان دهنده هیبریدهای M۱۱۵۸، M۱۱۰۲، M۱۱۶۰، M۱۱۱۶، M۱۱۰۶ هر کدام با چهار تکرار.



شکل ۲- ژل تهیه شده از نشانگر ناجفت PN۳. ستون اول از سمت چپ نشانگر اندازه DNA و ستون ۱ تا ۱۶ به ترتیب نشان دهنده ژنوتیپ های OT۱ تا OT۱۶، ستون ۱۷ تا ۲۱ نشان دهنده POL۱ و ستون ۲۲ تا ۲۶ نشان دهنده POL۲.



شکل ۳- ژل تهیه شده از نشانگر ناجفت PN۳. به ترتیب از چپ به راست ستون ۱ و ۲ نشان دهنده ژنوتیپ S_1-1، ستون ۳ و ۴ نشان دهنده S_1-2، ستون ۵ و ۶ نشان دهنده SM، S_1-3 نشانگر اندازه DNA، ستون ۷ و ۸ نشان دهنده S_1-4، ستون ۹ تا ۱۱ نشان دهنده S_1-5.

www.SID.ir

بوته های هموزیگوت غالب بین ۰ تا ۳۰ و ۷۰ تا ۱۰۰ درصد بود در نتیجه ابتدا داده ها با استفاده از تبدیل زاویه ای معکوس (آرک سینوس) (Yazdi Samadi et al., 2000) تبدیل و سپس تجزیه واریانس بصورت طرح کاملا تصادفی نامتعادل انجام گرفت که نتایج آن در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد تفاوت ژنوتیپ ها برای صفت درصد بوته های هموزیگوت غالب (بوته های فاقد نشانگر ناجفت) در سطح احتمال ۱٪ معنی دار می باشد. برای مقایسه میانگین ژنوتیپ ها و تعیین ژنوتیپ برتر از نظر صفت درصد بوته های هموزیگوت غالب، مقایسه میانگین ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. بر این اساس، ژنوتیپ ها به ترتیب زیر گروه بندی شدند (شکل۴).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس برای صفت درصد بوته های هموزیگوت غالب

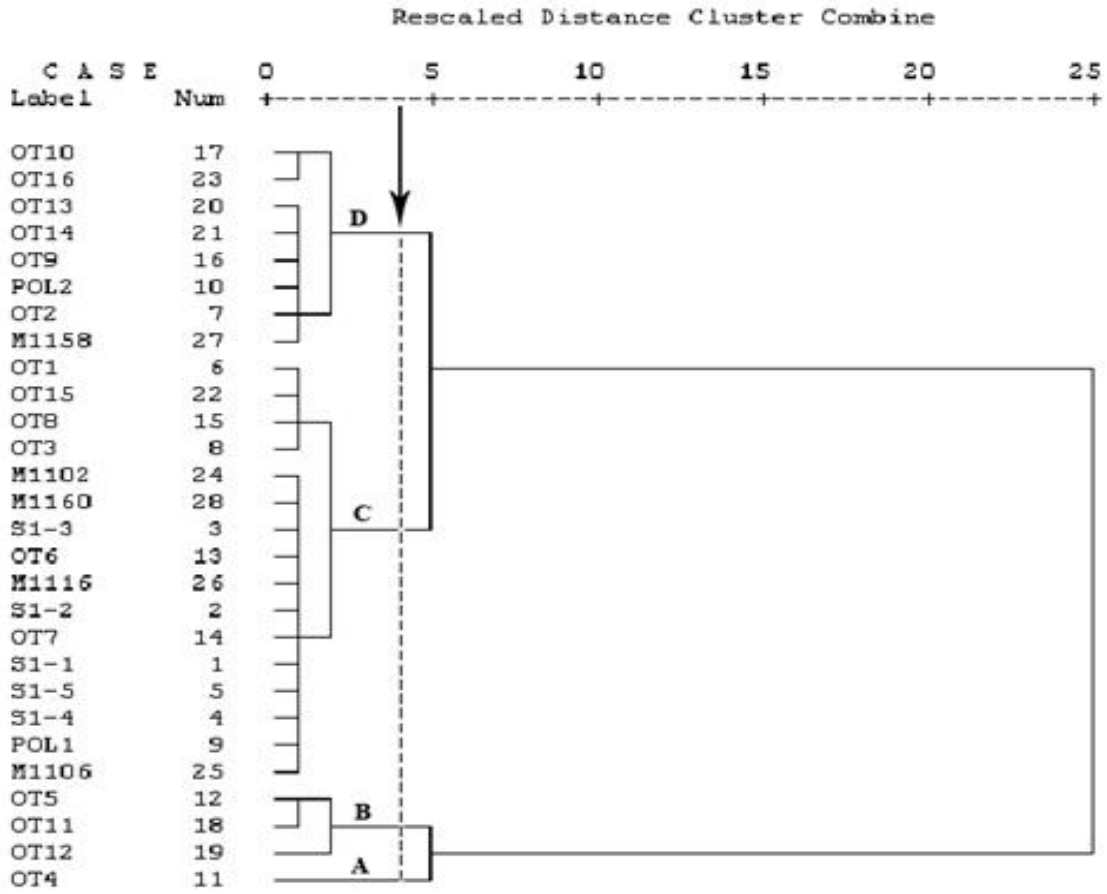
منابع تغییرات	درجه آزادی (*df*)	میانگین مربعات	F
ژنوتیپ	۲۷	۱۲۹۹/۸۲	۳۶/۷۸**
خطا	۷۷	۳۵/۳٤	
کل	۱۰٤		

شکل۴- مقایسه میانگین درصد بوته های هموزیگوت غالب در ژنوتیپ های مورد بررسی.

www.SID.ir

بحث

نتایج حاکی از آنست که ژنوتیپ های OT۱۲، OT۵ و OT۱۱ بیشترین درصد بوته های هموزیگوت غالب را نشان داده و ژنوتیپ های OT۱۶ و OT۱۰ فاقد بوته های هموزیگوت غالب می باشند. همچنین S۱ ها در حد واسط ژنوتیپ ها قرار گرفتند. اگرچه تجزیه کلاستر یک روش آماری چند متغیره است و برای گروه بندی افراد بر اساس چندین صفت مورد استفاده قرار می گیرد، اما چون در تحقیق حاضر صفت "درصد عدم حضور نشانگر ناجفت (درصد بوته های هموزیگوت غالب) " مورد مطالعه قرار گرفت، لذا برای پی بردن به میزان تشابه ژنوتیپ ها از نظر این صفت از تجزیه خوشه ای استفاده گردید. برای تجزیه خوشه ای ۲۸ ژنوتیپ بر مبنای درصد بوته های هموزیگوت غالب، روش UPGMA با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی به کار گرفته شد. پس از محاسبه تعداد تقریبی کلاسترها، ژنوتیپ ها به چهار گروه مجزا و جداگانه تفکیک شدند (شکل ۵). بر این اساس شانزده ژنوتیپ اوتایپ چغندر قند به چهار گروه تقسیم شدند که در دو گروه (A و B) فقط چهار ژنوتیپ اوتایپ با بیشترین درصد بوته های هموزیگوت غالب قرار گرفته و پنج ژنوتیپ S۱ در حد واسط گروه ها، دو ژنوتیپ گرده افشان و پنج ژنوتیپ هیبرید هر دو در گروه های کمترین و حد واسط قرار گرفتند. منشا ژنتیکی پنج ژنوتیپ هیبرید از تلاقی والد مادری اوتایپ و والد پدری مقاوم به ریزومانیا می باشد با این تفاوت که در ژنوتیپ های M۱۱۰۲، M۱۱۰۶ و M۱۱۱۶ والد پدری مقاوم Dorothea بوده و در ژنوتیپ های M۱۱۵۸ و M۱۱۶۰ والد پدری مقاوم Persia را می توان گزارش کرد. بر اساس نتایج به دست آمده از خوشه بندی ژنوتیپ ها چغندر قند در این آزمایش به نظر می رسد والد پدری Dorothea نسبت به والد پدری در ایجاد مقاومت به ریزومانیا موثرتر می باشد.



شکل۵ - دندروگرام تجزیه خوشه ای ۲۸ ژنوتیپ به روش UPGMA با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی.

www.SID.ir

از آنجایی که در برنامه اصلاحی برای تولید ژنوتیپ های S_1، تک بوته ها با زمینه ژنتیکی گوناگون خودگشن شده بودند، بعد از محاسبه درصد بوته های هموزیگوت غالب در توده های مختلف S_1 نتایج این آزمایش با سه نوع توده مواجه گردید؛ توده ای که در آن درصد بوته های هموزیگوت غالب تقریبا صفر بود، توده ای که برای این صفت در محدوده صد درصد بود که این دو توده به دلیل هموزیگوت بودن تک بوته های والدی از آزمون کای اسکور حذف گردیدند و توده سوم که با فاصله زیاد از این دو دامنه قرار داشت. توده سوم نشان دهنده هتروزیگوت بودن والد آن برای صفت مقاومت به ریزومانیا بوده و انتخاب گردید. برای آزمون توافق نسبت های مندلی مورد انتظار (۲۵ درصد) و نسبت های مشاهده شده، از آزمون کای اسکور تصحیح شده ی Yates با درجه آزادی یک استفاده گردید (Steel and Torrie., 1980). بر این اساس، ژنوتیپ های S_1 تفاوت معنی داری نشان ندادند.

جدول ۲- مقدار مربع کای (χ^2) برای پنج ژنوتیپ S_1

تیمارها	مقدار مربع کای (χ^2)
S_1-1	۰/۰۱^{ns}
S_1-2	۰/۶۵^{ns}
S_1-3	۲^{ns}
S_1-4	۰/۰۱^{ns}
S_1-5	۰^{ns}

نتیجه گیری

با توجه به درصد بالای بوته های هموزیگوت غالب مقاوم در ژنوتیپ های اوتایپ (OT۴، OT۱۱، OT۵ و OT۱۲) می توان از آن ها برای تهیه هیبرید های سینگل کراس به عنوان پایه مادری هیبریدهای تجارتی چغندر قند مقاوم به ریزومانیا استفاده نمود. هیبرید M۱۱۰۶ که والد پدری آن رقم تجارتی مقاوم Dorothea بوده در بین سایر هیبریدها از درصد مقاومت بیشتری بر اساس نتایج نشانگر PN۳ برخوردار است. همچنین وجود تعداد نسبتا بالای بوته های مقاوم در ژنوتیپ گرده افشان POL۱ نشان می دهد که انتخاب تک بوته های مقاوم از داخل آن و تهیه گرده افشان مناسب به عنوان والد پدری ارقام تجارتی مقاوم به ریزومانیا، امکان پذیر می باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می دانند از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج که بخشی از هزینه انجام این تحقیق را تامین نموده است، تشکر و قدردانی نمایند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

ایزدپناه ک، هاشمی پ، کامران ر، پاک نیت م، سهندپور آ و معصومی م. وجود گسترده بیماری ریشه ریشی (شبه Rhizomania) در فارس. مجله بیماری گیاهی. ۱۳۷۵؛ جلد۳۲، صفحات: ۲۰۶-۲۰۰.

توده فلاح م، ارجمندی ن و محمودی ب، بررسی وضعیت آلودگی و پراکنش بیماری ریزومانیا (ریشه گنایی) چغندر قند در ایران، خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. اصفهان. ۱۳۷۹. جلد دوم، صفحه ۷۲.

نوروزی پ و فقهی س م ا، شناسایی چند نشانگر مولکولی RAPD پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند. ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ۲۴-۲۲ مرداد ۱۳۸۸.

Amiri R, Mesbah M, Moghaddan M, Bihamta MR, Mohammadi SA and Norouzi P. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in Beta vulgaris. 2009; 53: 112-119.

Amiri R. Genetic studies on resistance to Rhizomania in S1, S2 and BC generations. Final report of research project. Sugar beet seed institute, Karaj, Iran, 2003a; Pp:21.

Amiri R. Identification of molecular markers linked to rhizomania resistance gene for rapid screening of beet germplasm. Final report of research project. Sugar beet seed institute, Karaj, Iran, 2003b; Pp:32.

Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian S, Ghannadha MR, Izadpanah K. 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 ,2003; 132:363-373.

Barzen ER, Stahal E, Fuchs D, Borchardt C, Salamini F. Development of coupling- repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet Rr1 allele conferring resistance to rhizomania. Mol Breeding, 1997; 3: 231-238.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A Plant DNA Mini-preparation: Plant Moecul Biol Reporter, 1992; 1: 19.

Giorio G, Gallitelli M, Cerrioro F. Molecular markers linked to Rhizomania resistance in sugar beet, Beta vulgaris, from two different sources map to the same linkage group. Plant Breeding, 1997; 116: 401-408.

Norouzi P. Identification of molecular markers linked to Rhizomania resistance gene(s) from Holly. Final report of research project. Sugar beet seed institute, Karaj, Iran, 2008; Pp:67.

Nouhi A A, Amiri R, Hagh Nazari A, Saba J, Mesbah M. Use of molecular marker for assay gene dosage resistant gene to rhizomania disease (Rz1) in sugar beet (Beta vulgaris L.). Asian J Biotech, 2009; 1(1) :37-41.

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

Archive of SID

www.SID.ir

Scholten OE, Klein – Lankhorst RM, Esselink DG, De Bock TSM, LongeW. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta accessions. Theor Appl Genet, 1997; 94: 123-130.

Scholten OE, De Bock TS, Klein – Lankhorst RM and Lange W. Inberitance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta vulgaris conferred by a second gene for resistance. Theor Appl Genet, 1999; 99; 740-746.

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

Steel RGD, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics ,A Biometrical Approach. McGraw-Hill, Inc, New York, 1980.

Yazdi Samadi B, Rezaei A, Valizadeh M. Statistical Designs in Agricultural Research. Tehran Univer sity publications, 2000.

Archive of SID

www.SID.ir

New Cell Mol Biotech J.1/4, 2011- novamber

Selection of Dominant Homozygous Plants Resistant to Rhizomaniain Cultivated Beta Germplasm Using RAPD-PN3 Marker

Falahzadeh R[1], Norouzi P[2], Rajabi A[3], Ebrahimi MA[4*]

[1,4] Department of Agricultural Biotechnology, Payam Noor University

[2,3] Sugar Beet Seed Institute (SBSI), Karaj

Abstract

Aim and background. In order to identify the dominant homozygous plants resistant to rhizomania within 28 sugar beet genotypes including 5 S1 populations, 16 O-type lines, two pollinators, and 5 hybrids amounting to 1551 field-grown single plants, and a repulsion-phase RAPD marker, (named PN3) were linked to rhizomania resistance.

Materials and methods. DNA was extracted from the leaves of single plants. RAPD-PCR test was carried out on the samples using the primers. According to the data, analysis of variance for the percentage dominant homozygous plants was conducted using unbalanced completely randomized design.

Results. The Results indicated that the genotypes were significantly different in percentage for the dominant homozygous plants. Means comparison by Duncan's multiple range test showed that the genotypes OT5, OT11 and OT12 had the highest percentage of marker presence. Also, by applying cluster analysis the studied genotypes were classified into four clusters with the cluster B having the genotypes of the highest dominant homozygous plants.

Conclusion. It can be concluded that the PN3 marker could be used for rapid screening of sugar beet germplasm at the stages of resistant plants selection in a resistant cultivar development program.

Key words. Sugar beet, Rhizomania, RAPD-PN3 marker

*** Corresponding Author:**
Address: Department of Agricultural Biotechnology, Payam e Noor University, Iran.
Email: ebrahimi_mpn@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir