شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن(های) مقاومت به نماتد مولد سیست چغندرقند

Identification of molecular markers linked to sugar beet cyst nematode resistance gene(s)

نسیم رحمانی[1]*، محمود مصباح[2] و پیمان نوروزی[3]

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۷

ن. رحمانی، م. مصباح و پ. نوروزی. ۱۳۹۱. شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن(های) مقاومت به نماتد مولد سیست چغندرقند. **مجله چغندرقند ۲۸(۲): ۱۵۸-۱۴۹**

چکیده

با توجه به اهمیت وگستردگی نماتد مولد سیست چغندرقند (*Heterodera schachtii* Schmidt) در جهان و به منظور جلوگیری از کاهش قابل توجه محصول ریشه و قند ناشی از این نماتد تلاش‌های زیادی صورت می‌گیرد و مناسب‌ترین روش مدیریت آن اصلاح ارقام مقاوم می‌باشد. گونه‌های وحشی گروه *procumbentes* در جنس *Beta* به‌دلیل داشتن ژن‌های مقاومت به بیماری‌های مختلف چغندرقند ازجمله مقاومت به نماتد اهمیت زیادی دارند. برای شناسایی نشان‌گرهای مولکولی DNA پیوسته با ژن(های) مقاومت به نماتد مولد سیست چغندرقند از آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی و توالی‌های اختصاصی استفاده شد. برای این منظور، در ابتدا جمعیت‌های درحال تفکیک برای ژن(های) مقاومت به نماتد انتخاب گردیدند. پس از کشت بذر، نشاء این جمعیت‌ها با حدود ۱۰۰۰ لارو نماتد در چند نوبت، تلقیح شدند. گیاهان مقاوم (با کمتر از ۱۰ سیست) و گیاهان حساس(بابیشتر از۱۰ سیست) شناسایی و به دو گروه تقسیم شدند. در مرحله بعد با استفاده از آغازگرهای انتخابی مانند: OP-Y-10,OP-B-11, OP-D-13, OP-G-02, OP-x-15, OP-x-02، Sat-121 و الیگونوکلئوتیدهای TGAACACCTTTCAAAT، CGTAAGAGACTATGA و ۱۰۰ آغازگر از کیت‌های شرکت اپرون، آزمون PCR، انگشت‌نگاری نمونه‌ها و مقایسه الگوی نوارهای DNAی دوگروه، انجام شد بین مقاومت در گیاه و حضور نوار خاصی از توالی DNA تکثیر شده، با نشان‌گر Sat-121، ٦٦/٦٤ درصد پیوستگی و هم چنین بین مقاومت در گیاه و حضور نوار خاصی از توالی DNA تکثیر شده، با نشان‌گر OP-D-13، ٦٦/٩١ درصد پیوستگی مشاهده شد که این دو نشان‌گر می‌توانند در غربال ژنوتیپ‌های مقاوم در شرایط آزمایشگاهی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، مقاومت، نماتد مولد سیست، نشان‌گرهای مولکولی

۱- فارغ التحصیل کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران * - نویسنده مسئول
rahmani_nassim@yahoo.com
۲ - استاد مؤسسه تحقیقات ثبت وگواهی بذر و نهال- کرج
۳- استادیار موسسه تحقیقات چغندرقند- کرج

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

از مدت‌ها قبل محصول چغندرقند تحت تأثیرخسارت آفات و بیماری‌های مختلفی ازجمله نماتد مولد سیست چغندرقند (*Heterodera schachtii* Schmidt) قرار گرفته است. اولین نشانه‌های بیماری، ضعف، زردی و کاهش رشد است. بوته‌های آلوده کوتوله شده و ریشه‌های آن‌ها کوچک، بدشکل، دارای ریشک‌های فرعی بسیار افشان می‌باشد و روی ریشه‌های فرعی سیست‌های سفید رنگ رویت می‌شود (Mohamadi goltape et al. 1998). کاهش عملکرد ریشه چغندرقند در اثر حمله نماتدها حدود ۱۰درصد برآورده شده که حدود ۹۰درصد این کاهش مربوط نماتد مولد سیست است. بنابراین به‌عنوان یکی‌از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای چغندرقند درجهان شناخته شده است (Sandal et al. 1997). در ایران مناطقی از استان‌های خراسان، اصفهان، فارس، آذربایجان غربی، کرمانشاه و کرمان، آلوده به این نماتد هستند (Ahmadi et al. 1994). با توجه به آن که 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 بعضی از گیاهان از عامل آلوده کننده به‌نحوی می‌گریزند (Escape) و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان روش تکمیلی یا جایگزین می‌توان گیاهان در بردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. بنابراین نشان‌گرهای DNA می‌توانند ابزارهای مفیدی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم باشند و باعث صرفه‌جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب گردند (Norouzi 2003).

درون گونه‌های وحشی چغندر حداقل سه ژن مقاومت به نماتد روی کروموزوم‌های مختلف بخش Procumbentes قرار دارند که شامل ژن *Hs1* در کروموزوم شماره یک هر سه گونه Procumbentes، ژن *Hs2* در کروموزوم شماره هفت گونه *Beta procumbens* و *B. webbiana* و ژن *Hs3* در کروموزوم شماره هشت گونه *B. webbiana* می باشد. ژن‌های مقامت به نماتد سیستی چغندرقند از خزانه ژنی گونه‌های وحشی جنس *Beta* به درون لاین‌های اصلاحی وارد شده‌اند (Kleine et al. 1998).

سالنتین و همکاران (Salentijn et al. 1994) موفق به یافتن توالی‌های تکراری Sat-121 شدند که با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندر پیوستگی شدیدی دارد (Mesbah 1997). هم چنین این افراد تعدادی توالی آغازگر تصادفی شناسایی کردند، که با ژن فوق‌الذکر پیوستگی نشان می‌دادند. هالدن و همکاران (Hallden et al. 1997) از تکنیک RAPD با استفاده از تعدادی توالی آغازگر برای شناسایی ژن(های) مقاومت به نماتد سیستی چغندر بهره‌برداری نمودند. مصباح و همکاران (Mesbah et al. 1997) موفق به شناسایی سه قطعه توالی DNA تکراری به

Archive of SID

www.SID.ir

نام OPX2، PB6-4 و Sat-121 در ژنوم گونه‌های وحشی چغندر از گروه Procumbentes شدند که با ژن(های) مقاومت به نماتد پیوستگی ژنتیکی داشتند. کای و همکاران (Cai et al. 1997) با استفاده از نشانگرهای ساتلیت اختصاصی ژنوم موفق به جداسازی اولین ژن مسئول ایجاد مقاومت به نماتد بنام $Hs1^{pro-1}$ شدند. با مقایسه توالی ناحیه رمزکننده ژن *Hs1* در سه گونه Procumbentes مشخص شده است که بین *B. procumbens* و *B. webbiana* حدود ۹۶درصد و بین *B. procumbens* و *B. patellaris* حدود ۹۳درصد مشابهت توالی وجود دارد (kleine et al.1998). ژن*Hs1* با منشا گونه *procumbens* موسوم به $Hs1^{pro-1}$ بوده که بیش از سایر منابع جهت انتقال به ارقام زراعی چغندرقند به کار رفته است. این ژن مقاومتی تک ژنی و غالب را ایجاد می‌نماید (Kleine et al.1998). البته در بین نشانگرهایی که برای این ژن تا به حال تعیین شده است گاهی اوقات دیده می‌شود که گیاهانی مقاوم به نماتد سیستی بوده ولی نشانگر مربوطه را نشان نمی‌دهند (Salentijn 1995). بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که علاوه‌بر آزمون برخی از نشانگرهای قبلی به دنبال نشانگرهای جدید نیز بود. دراین تحقیق، با کمک آغازگرهای تصادفی RAPD و الیگونوکلئوتیدهای انتخاب شده، هدف بررسی و شناسایی نشانگرهای مولکولی است که به توان از آن‌ها در غربال ژنوتیپ‌های مقاوم به نماتد در شرایط آزمایشگاهی بهره‌برداری نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده

ژنوتیپ W1009 که یک لاین جابجایی (Translocation line) با منشاء *B.procumbens* می‌باشد و دارای مقاومت عمودی نسبت به نماتد مولد سیست است. بذر گیاهان حاصل از خودگشنی، هیبریدهای به‌دست آمده از تلاقی لاین جابجایی (W1009) با ارقام اصلاحی چغندرقند، شامل چهار تلاقی (MSC2×W1009)-1 ×231، (9801×W1009)231× ، (20447×W1009)231× ، (20314×W1009) ×231، ارقام تجاری نماکیل (NEMAKIL) و رسول (RASOUL) به‌ترتیب به‌عنوان شاهد مقاوم و حساس در آزمایش ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های منتخب چغندرقند نسبت به نماتد مولد سیست مورد استفاده قرار گرفتند.

مقاومت چند ژنوتیپ منتخب چغندرقند نسبت به نماتد مولد سیست در دو آزمایش جداگانه (درسال ۱۳۸۴) در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه بررسی شد. در هر آزمایش از هر ژنوتیپ۵۰ گیاهچه توسط لاروهای فعال سن دوم نماتد مایه‌زنی شد. به هر گیاهچه ۱۰۰۰ لارو نماتد در چند نوبت مایه‌زنی گردید. نه هفته پس از آخرین مایه زنی لارو، تعداد سیست تشکیل شده روی ریشه و درون ماسه اطراف هر گیاهچه شمارش و مبنای مقایسه مقاومت ژنوتیپ‌ها قرار گرفت. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شد.

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج DNA ژنومی گیاه

نه گیاه از مقاوم‌ترین و نه گیاه از حساس‌ترین گیاهان تلاقی (20314×W1009)×231 برای تهیهٔ بالک ژنومی انتخاب گردیدند. هم چنین کلیهٔ گیاهان مقاوم تلاقی‌های (9801×W1009)×231، (20447×W1009)×231 ، (20314×W1009)×231، (MSC2×W1009)-1×231 و نیز حساس‌ترین گیاهان این تلاقی‌ها جهت آزمون نشان‌گر مولکولی به صورت تک بوته انتخاب شدند. به‌علاوه از گیاهان حاصل از خودگشنی تک بوته‌های مقاوم لاین جابجایی هم برای تأیید نشان‌گر مورد آزمایش، استفاده گردید.

بعداز انتخاب گیاهان بالک مقاوم و حساس، استخراج DNA آن‌ها به‌روش نوروزی(2003) انجام گرفت و بعداز آزمون نشان‌گر روی آن‌ها، جهت تعیین پیوستگی نشان‌گر موردنظر با ژن مقاومت روی تک بوته‌ها، DNA تمام گیاهان مقاوم و حساس بوته‌های تلاقی‌های (9801×W1009)×231 ، (20447×W1009)×231 ، (20314×W1009)×231 ، (MSC2×W1009)-1×231 نیز استخراج شدند.

آزمون RAPD– PCR

DNA ژنومی، به همراه بافر PCR، dNTP ۲۰۰ میکرو مولار، ۲۵ نانوگرم آغازگر و یک واحد آنزیم Smartaq پلیمراز در حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت.

آغازگرهای مورد آزمون

آغازگرهای تصادفی OP-X-15, OP-X-02 ,OP-Y-10 ,OP-B-11, OP-D-13, OP-G-02, و الیگونوکلئوتیدهای TGAACACCTTTCAAAT، CGTAAGAGACTATGA مربوط به توالی تکراری Sat- 121 و صد آغازگرتصادفی از کیت‌های C,D,F,G,M شرکت اپرون برای تکثیر قطعات ژنومی استفاده شدند، تفکیک قطعات تکثیری با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام گرفت و ژل‌ها در محلول اتیدیوم بروماید یک میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۰–۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و نوارهای DNA توسط لامپ ماورای بنفش رؤیت گردیده و توسط دوربین عکس برداری شد.

تجزیه آماری

تجزیه و تحلیل آماری جهت تعیین همبستگی بین نتایج حاصل از آغازگر OP-D-13 با آغازگر Sat-121 توسط نرم‌افزار Excel با تشکیل جدول صفر و یک که در آن یک نشانه حضور نوار موردنظر و صفر نشانه عدم حضور نوار موردنظر بود، انجام گرفت و ۸۸ درصد تعیین گردید.

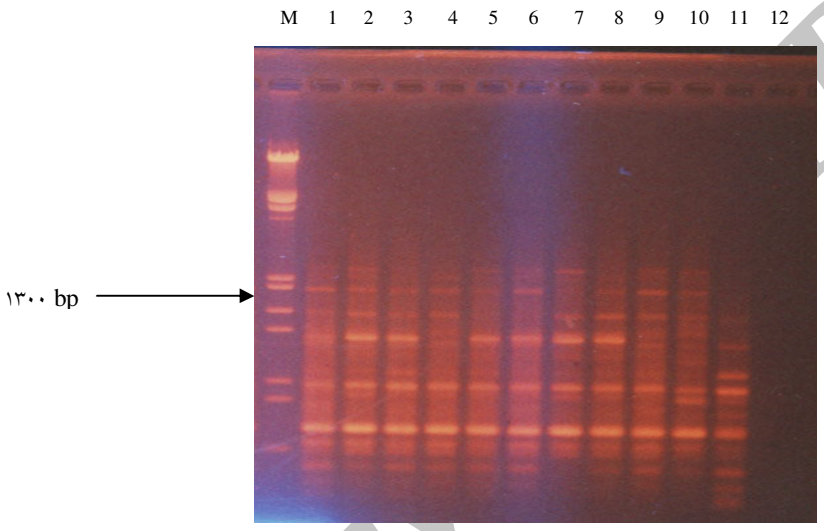
نتایج و بحث

نتایج نشان داد در هر دو آزمایش ژنوتیپ‌ها از نظر صفات فوق اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند. آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد

Archive of SID

www.SID.ir

ژنوتیپ‌ها را در سه گروه مقاوم، حساس و بسیارحساس دسته‌بندی کرد. منابع مقاوم W-1010 , W-1009 و رقم تجاری مقاوم Nemakil با کمترین تعداد سیست در گروه مقاوم و رقم تجاری رسول با برخی هیبریدهای مورد بررسی جزو حساس ترین ژنوتیپ‌ها دسته‌بندی شدند. از بین آغازگرهای تصادفی آزمون شده ، OP-D-13 در ناحیهٔ حدود ۱۳۰۰ bp چندشکلی نشان داد. به این معنی که گیاهان مقاوم البته نه همه دارای نواری در حدود ۱۳۰۰ bp بودند ولی این نوار در گیاهان حساس دیده نشد. شکل یک الگوی نواربندی نمونه‌ها توسط آغازگر OP-D-13 را نشان می‌دهد.

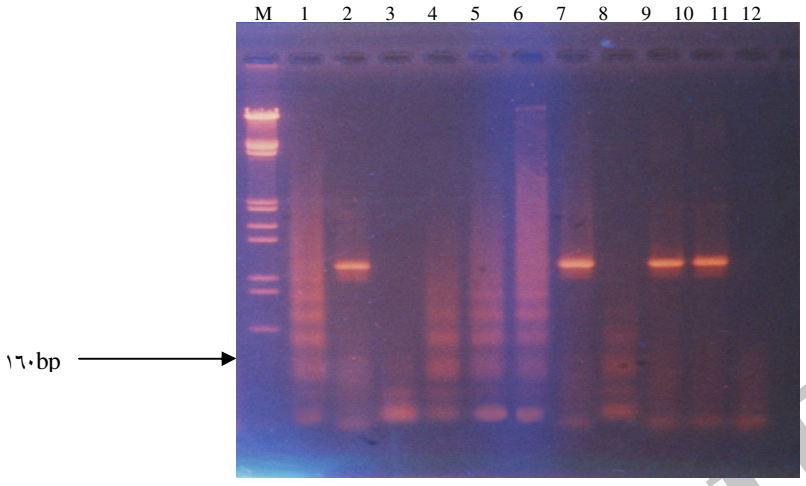


شکل۱ الگوی نواربندی RAPD نتایج آغازگر OP-D-13 از چپ به راست M= نشانگر وزن مولکولی (EcoRI/Hind III+DNAλ)، 1 بالک مقاوم حاصل از تلاقی (20314*W1009)*231، 2,3,4…9 تک بوته‌های مقاوم حاصل از تلاقی (20314*W1009)*231، 10 تک بوته حساس از تلاقی (20314*W1009)*231، 11 بالک حساس حاصل از تلاقی (20314*W1009)*231 و 12 Master mix بدون DNA

در ارتباط با آغازگرهای اختصاصی توالی تکراری Sat-121 که روی دو بالک حساس و مقاوم، تک بوته‌های حساس و مقاوم، هم چنین گیاهان خودگشن حاصل‌از لاین جابجایی مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. وجود شرّه (smear) و نوار حدود bp ۱۶۰ در بالک مقاوم و عدم وجود آن، در بالک حساس نشانه وجود چندشکلی بود. نتایج بررسی چندشکلی روی تک بوته‌های مقاوم و حساس نشان داد که هیچ گیاه حساسی نوار ۱۶۰bp و حالت شرّه را تولید نمی‌کند، به عبارت دیگر هر جا نوار ۱۶۰bp و شرّه دیده شد ،گیاه مقاوم بود ولی این نوار و شرّه در تمام گیاهان مقاوم مشاهده نگردید. شکل دو الگوی نواربندی نمونه‌ها توسط آغازگرهای Sat-121 را نشان می دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲ الگوی نواربندی نمونه‌ها توسط آغازگرهای Sat-121 از چپ به راست M = (EcoRI/Hind III+DNAλ) Size marker، 1 بالک مقاوم حاصل از تلاقی (20314*W1009)*231 ، 2,3,4…9 تک بوته‌های مقاوم حاصل از تلاقی (20314*W1009)*231 ، 10 نمونه حساس از نتایج تلاقی (20314*W1009)*231 ، 11 بالک حساس از نتایج تلاقی (20314*W1009)*231 و 12 Master mix بدون DNA.

بحث

آغازگرهای توالی تکراری Sat-121 بر روی دو بالک حساس و مقاوم ، تک بوته‌های حساس و مقاوم و گیاهان خودگشن مورد آزمایش PCR قرار گرفت. وجود شرّه و نوار حدود ۱۶۰bp در بالک مقاوم و عدم حضور آن در بالک حساس تفاوت در الگوی نواردهی بود. البته این الگو در تمام تک بوته‌های مقاوم تکرار نشد، ولی هر جا حالت شره و نوار bp ۱۶۰ مشاهده شد گیاه مقاوم بود.

لانگ و همکاران (Lange et al. 1994) با استفاده از آغازگر Sat-121 گزارش کردند 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 به‌عنوان 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 (Salentijn et al. 1994) با دو جمعیت مختلف تلاقی برگشتی مورد آزمایش قرار گرفت. تفاوت در الگوی نواربندی وجود نوار ۱۵۹bp در گیاهان مقاوم در مقابل عدم حضور این نوار در گیاهان حساس بود. البته در جمعیت اول از بین ۱۸۷ گیاه مورد آزمون، سه گیاه مقاوم فاقد توالی Sat-121 بودند، و در جمعیت دوم از میان ۱۷۴ گیاه تحت آزمایش هشت گیاه مقاوم فاقد توالی Sat-121 مشاهده شده بود. مصباح و همکاران (Mesbah et al. 1997) موفق به شناسایی قطعهٔ تکراری Sat-121 شدندکه اختصاص به ژنوم گونه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

گروه procumbentes داشته و با گونهٔ *B.vulgaris* پیوند برقرار نمی‌کرد.

سالنتین وهمکاران (Salentijn et al. 1994) از آغازگرهای تصادفیRAPD، به اسامی OP-X-02 ,OP-X-15, OP-Y-10, OP-B-11 استفاده نمودند. از میان آنها آغازگر OP-X-02 در گیاهان دارای قطعهٔ کروموزومی $Hs1^{pro-1}$ چندشکلی در حدود 1100bp در الگوی نواربندی نشان داد و بقیهٔ آغازگرها در گیاهان دارای قطعهٔ کروموزومی $Hs1^{Pat-1}$ تفاوت در نواربندی داشتند. با وجود تشابه توالی حدود ۹۳ درصد بین $Hs1^{pro-1}$ و $Hs1^{Pat-1}$ با این حال نشانگرهای $Hs1^{Pat-1}$ قادر به شناسایی گیاهان دارای $Hs1^{pro-1}$ نبودند و این احتمالاً به علت تفاوت نواحی اطراف این دو ژن و به عبارت دیگر تفاوت در محل اتصال آغازگر می باشد.

در تحقیق حاضر، آغازگرهای تصادفی RAPD، شامل OP-X-02,OP-X-15, OP-Y-10, OP-B-11 مورد آزمون PCR قرار گرفتند، که در هیچ‌کدام تفاوتی در الگوی نواربندی دیده نشد.

مصباح و همکاران(Mesbah et al. 1997) در آزمایشهای خود تأیید کردند که توالی تکراری OP-X-02 در ژنوم گونه های گروه Procumbentes با ژن(های) مقاومت به نماتد مولد سیست پیوستگی نشان می‌دهد. این مسئله توسط آزمایش ما تأیید نگردید. عدم مشاهدهٔ تفاوت بین گیاهان حساس و مقاوم در آزمایش حاضر ممکن است به این دلیل باشد که در آزمایش مصباح و همکاران (1997) ازیک گیاه با کروموزوم اضافی Procumbens (monosomic addition line) استفاده شده ولی در آزمون PCR انجام شده در تحقیق حاضر از گیاهان لاین جابجایی که دارای قطعه‌ای از ژنوم procumbens می‌باشد و یا نتایج تلاقی لاین جابجایی با رگه‌های زراعی چغندرقند استفاده شده بود و ممکن است محل اتصال آغازگر جزء قسمت منتقل شده نباشد.

هالدن و همکاران (Hallden *et al.* 1997) برای شناسایی ژن‌های مقاومت به نماتد مولد سیست چغندرقند از طریق روش تجزیهٔ تفرق توده (bulk segregetion analysis) از آغازگرهای تصادفی RAPD شامل OP-D-13 , OP-G-02 , OP-H-03 , OP-H-15 , OP-K-20 , OP-L-10 , OP-AA-09 , OP-AH-09 استفاده نمودند که نتایج آزمایش‌های آن‌ها نشان دهندهٔ پیوستگی نشانگرهای، OP-D-13، OP-G-02 ، OP-H-03، OP-H-15، Op-K-20، OP-L-10 ، OP-AA-09 و OP- AH-09 با ژن مقاومت بود. فاصله سه آغازگر OP- AH-09, OP-D-13 , OP-G-02 از ژن $Hs1$ به ترتیب ۰/۲ ، ۱/۲ ، ۱/۵ سانتی مورگان به دست آمد.

در تحقیق حاضر آغازگرهای تصادفی RAPD شامل OP- , OP-D-13 , OP-G-02 , OP-H-03 , OP-H-15 , OP-K-20 , OP-L-10 OP-AA-09 , OP-AH-09 استفاده گردید که از میان آن‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

آغازگرهای , OP-D-13 و OP-G-02 به ترتیب نوارهایی با طول حدود ۱۳۰۰ bp و ۸۵۰bp در بالک مقاوم تولید کردند که دربالک حساس چنین نوارهایی دیده نشد. این تفاوت در الگوی نواربندی ، درآغازگر OP-G-02 در تک بوته‌ها تکرار نشد و حاصل چندشکلی تصادفی بود اما در مورد آغازگر OP-D-13 تفاوت در الگوی نواری تکرار شد.

ساندل و همکاران (Sandal et al. 1997) گزارش کردند که در بین گیاهانی که ژن *Hs*1 به آن‌ها منتقل شده بود ، گیاهان مقاومی یافتند که ژن *Hs*1 را از دســت داده بودند و هم چنین 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. در میان گیاهان تلاقی برگشتی مورد آزمایش ،گیاهان مقاومی مشاهده شدند که نه ژن *Hs*1 را داشتند و نه با نشانگرهای پیوسته با ژن *Hs*1 پیوستگی نشان می‌دادند. ژن *Hs*1 منتقل شده به گیاه حساس می‌تواند در اولین تقسیم میوزی در اثر ایجاد لوپ حذف شده باشد.

اما از آن جایی که این گیاهان در آزمایش گلخانه‌ای مقاوم بودند، پس به نظر می‌رسد علاوه بر فرض گریز از بیماری احتمالاً بیش از یک ژن در ایجاد مقاومت نقش داشته باشد، به طوری که برخی گیاهان مقاوم فاقد ژن *Hs*1 بوده‌اند. در تحقیق حاضر، دو نشانگر مولکولی پیوسته با ژن (های) مقاومت به نماتد مولد سیست چغندرقند به دست آمد که حضور هر یک از این دو نشانگر با مقاومت فنوتیپی گیاه همبستگی کامل داشت و ضمناً در هیچ گیاه حساسی دیده نشدند .

تجزیه و تحلیل آماری جهت تعیین همبستگی بین نتایج حاصل از آغازگرOP-D-13 و آغازگر Sat-121 توسط نرم افزار Excel با تشکیل جدول صفر و یک که در آن یک نشانه حضور نوار موردنظر و صفر نشانه عدم حضور نوار موردنظر بود ،انجام گرفت و ۸۸ درصد تعیین گردید. مقایسه همبستگی نتایج حاصل از ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند و نتایج آزمایش نشانگرهای مولکولی توسط نرم‌افزار Excel با تشکیل جدول صفر و یک که در آن یک نشانه گیاه مقاوم و صفر نشانه گیاه حساس بود انجام گرفت، بر این اساس نتایج حاصل از ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند و نتایج آزمایش نشانگر مولکولی Sat-121 ۶۶/۶۴ درصد پیوستگی نشان می‌داد و بین نتایج حاصل از ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند و نتایج آزمایش نشانگر مولکولیOP-D-13 ۶۶/۹۱ درصد پیوستگی وجود داشت . جهت به دست آوردن فاصله تقریبی نشانگر مولکولیOP-D-13 از ژن مقاومت از نسبت تعداد بوته‌های نوترکیب (۴۴) به تعداد کل بوته‌ها (۱۳۳) استفاده گردید و فاصله نشانگر مولکولی-OP D-13 از ژن ۰/۳۳ تعیین گرید.

بنابراین می‌توان از نشانگرهای حاصل در اصلاح ارقام مقاوم به نماتد جهت غربال ژنوتیپی گیاهان مقاوم بهره برد.

Archive of SID

www.SID.ir

References: منابع مورد استفاده:

Ahmadi E, Hejarood Gh, Shrifi tehrani E, Kheiri A, Akhyani A. The first report of isolation and identification of *Paecilomyces farinosus* from cyst nematode of *Heterodera schachtii* and study it`s antagonistic effect on nematode eggs in Iran. Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress.1394. P354

Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Lankhorst RMK, Salentijn EMJ, Lange W, Stiekema WJ, Wyss U, Grundler MW, Jung C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science. 1997. 275: 832-834.

Hallden C, Sall T, Olsson K, Nilsson NO, Hjerdin A. The use of bulked segregant analysis to accumulate RAPD markers near a locus for beet cyst nematode resistance in Beta vulgaris. Plant Breed. 1997. 116: 18-22.

Jassem B. Apomixis in the genus *Beta.* Apomixis News Letter. 1990. 2:7-23.

Kleine M, Voss H, Cai D, Jung C. Evaluation of nematode resistant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines by molecular analysis. T. A. G. 1998. 97: 896-904.

Lange W, De Bock TSM. Pre-breeding for nematode resistance in beet, J. of Sugar Beet Res. 1994. 31:13-26.

Mesbah M. Characterisation of Alien Chromosomes in Monosomic Additions of Beta. Ph.D. thesis. Wageningen .Agricultural University. 1997.

Mesbah M, Bock TSM, Sandbrink JM, Lankhorst RMK, Lange W. Molecular and morphological characterization of monosomic additions in *Beta vulgaris*, carrying extra chromosomes of *B. procumbens* or *B. patellaris*. Mol. Breed. 1997. 3: 147-157.

Mohamadigoltapei A, Pakdamansardroodi B, Rezaeedanesh y. Diseases caused by biotic and Sugar beet disturbances. Tarbiat Modarres University Press. 1998. Pp 84-89

Norouzi P. The Simple and effective method for Genomic DNA extraction from plant and Fungus for PCR-based analyses. 2003. Pp 175-176

Archive of SID

www.SID.ir

Salentijn EMJ, Sandal NN, Lankhorst RK, Lange W, Bock SMD, Marcker KA, Stiekema WJ. Long range organization of a satellite DNA family flanking the beet cyst nematode resistance locos(Hs1) on chromosome-1 of *B. patellaris* and *B. procumbens*. Theoretical and Applied Genetics. 1994. 89: 459-466.

Salentijn EMJ. Molecular characterization of the beet cyst nematode(*Heterodera schachtii*) resistance locus *Hs1*. Ph.D Thesis. Wageningen University. Netherlands. 1995. Pp:75-88.

Sandal NN, Salentijn EMJ, Kleine M, Cai D, Reuver M R, Druten MV, Bock TSM, Lange W, Steen P, Jung C, Marcker K, StiekemaWJ and Lankhorst RMK. Backcrossing of nematode-Resistant sugarbeet: a second nematode resistance gene at the Locus containing $Hs1^{pro-1}$. Mol. Breedg. 1997. 3: 471-480.

Whitney ED, Duffus E. Compendium of Beet Diseases and Insects, APS press. 1991. 76p.

Archive of SID

www.SID.ir