شناسایی و تایید یک نشانگر مولکولی ناجفت RAPD پیوسته با ژن یا ژنهای مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند

سمانه اروجعلیان (۱ و ۲)، پیمان نوروزی (۲)، محمدرضا بی همتا (۳)، سید باقر محمودی (۲)، کیومرث نورخلج (۱)، آرش کریمی افشار (۱)

۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ۲ - موسسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند ۳- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

در این بررسی از جمعیت در حال تفکیک F2 برای شناسایی نشانگر مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به بیماری ویروسی ریزومانیای چغندرقند استفاده گردید. در این تحقیق از آغازگرهای تصادفی ده نوکلئوتیدی به صورت تکی و جفتی برای آزمون RAPD بر روی DNA بالک مقاوم و حساس بر اساس تجزیه تفرق توده (BSA) استفاده شد. تعدادی از جفت آغازگرها در بالک های DNA تولید چند شکلی نمودند، پس از آزمون این جفت آغازگرها بر روی DNA تک بوته بالک های حساس و مقاوم، تعدادی از آنها انتخاب و در تک بوته های جمعیت نیز ارزیابی شدند. سپس فواصل نشانگرها و ژن ایجاد مقاومت با استفاده از روش فراوانی بوته های نوترکیب تعیین گردید. از بین نشانگرهای منتخب یک نشانگر ناجفت با فاصله حدود ١٤ سانتی مورگان بهدست آمد. سپس به منظور تایید و تکرارپذیری نشانگر مربوطه این بررسی در چندین توده و لاین اصلاحی چغندرقند انجام گرفت. برای این منظور بذر ژنوتیپ های مورد نظر در گلخانه کشت شده و گیاهان دو ماهه به گلدان های حاوی خاک آلوده به ریزومانیا منتقل شدند. پس از گذشت دو ماه در خاک آلوده گیاهان خارج و نمونه برداری ریشه و برگ آنها به طور جداگانه انجام گرفت. ریشه نمونه ها برای آزمون الایزا جهت سنجش میزان آلودگی و نمونه های برگی برای آزمون مولکولی ژنوتیپ های گیاهان مورد نظر با نشانگر مولکولی ناجفت به دست آمده استفاده گردید. نتایج الایزا به صورت حساس، مقاوم و متحمل دسته بندی شدند. نتایج نشانگر به صورت حضور و عدم حضور امتیاز دهی گردید. سپس با مقایسه نتایج الایزا و آزمون مولکولی مشخص گردید که حدود ۹۵ درصد بین نتایج دو آزمون مذکور توافق و هماهنگی وجود دارد و بدین ترتیب نشانگر نامبرده از درجه اعتبار بالایی جهت غربال مولکولی گیاهان مقاوم به ریزومانیا برای بهره برداری در طرح های تهیه ارقام برخوردار می باشد.

واژه های کلیدی: چغندرقند ،ریزومانیا، نشانگر مولکولی، RAPD

مقدمه

چغندر قند(*Beta vulgaris . L*) از مهمترین منابع تامین کننده ساکارز می‌باشد (۱). بیماری ریشه ریشی چغندرقند (Rhizomania) که عامل آن نوعی ویروس (BNYVV) است از جمله بیماری‌های مخربی است که با حمله به سیستم ریشه‌ای گیاه ظاهر ضعیف و ریش ریش مانندی را ایجاد می‌کند و باعث کاهش عملکرد ریشه‌ها به میزان ۵۰٪ یا بیشتر و عیار قند تا کمتر از ۱۰ درصد می‌شود. (٦)

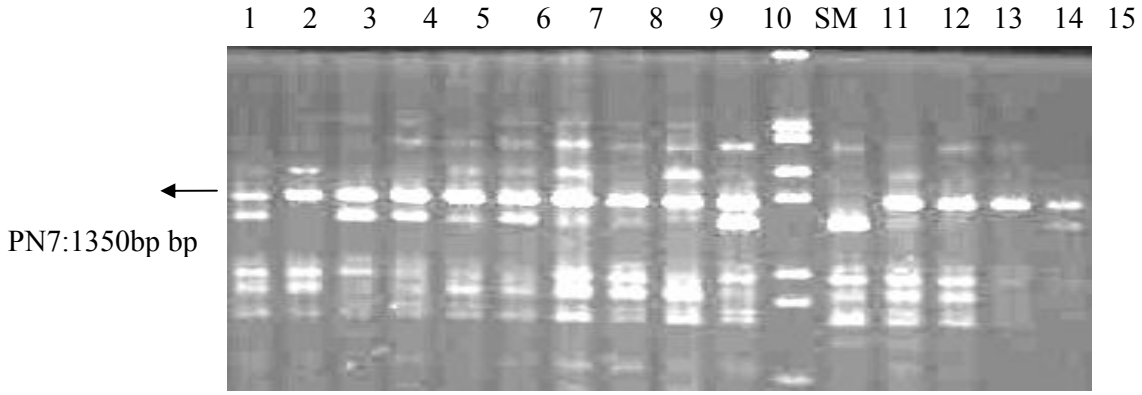
مواد و روش ها

DNA هفت گیاه با کمترین مقادیر جذب الایزا (توده مقاوم) و هفت گیاه با بیشترین مقادیر جذب الایزا (توده حساس) در جمعیت F_2 مورد نظر، به صورت جداگانه و با نسبت مساوی مخلوط گردید. اندازه گیری غلظت ویروس در ریشه چه گیاهان با استفاده از آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) مطابق روش معمول Clark و Adams (٤)، که در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج بهینه‌سازی شده بود انجام شد (۲). استخراج DNA با روش دلاپورتای تغییر یافته در آزمایشگاه انجام شد (۵).

نتایج و بحث

نشانگر PN7 دارای باندی در اندازهٔ bp ۱۳۵۰ (جفت باز) است(شکل۱). به صورت نشانگر ناجفت(Repulsion) می‌باشد، ابتدا دو بالک حساس و مقاوم مورد آزمون مولکولی قرار گرفتند و پس از تایید نتیجه، ادامه بررسی‌ها روی جمعیت F2 صورت گرفت و فاصله این نشانگر از ژن مربوطه روی ٤١ بوته از جمعیت F2، با استفاده از روش بارزن ١٤/٦ سانتی‌مورگان

برآورد شد(۳). این نشانگر به صورت جفتی روی هر یک از جمعیت‌ها مورد آزمون مولکولیRAPD قرار گرفته است درصد حضور و درصد توافق با استفاده از فرمول‌های زیر به دست آمد و نتایج به دست آمده در جدول ۱ می‌باشند.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگرPN7 ، از چپ به راست : از شماره ۱ تا ۱۰ نمونه‌های گیاهان O-Type، سایز مارکر، از شماره ۱۱ تا ۱۵ نمونه‌های گیاهان O-Type

جدول۱- نتایج به دست آمده مربوط به PN7

ردیف	انواع ژنوتیپ	تعداد کل ژنوتیپهای مورد بررسی	درصدحضور نشانگر	درصد توافق نشانگر با الایزا
۱	S1	۱۰۵	-	۹٦/۱۹
۲	S2	۵۲	-	۹۸/۰۷
۳	O-type	۱۳٤	-	۹۷/۰۱
٤	میانگین سه توده بالا	۲۹۱	-	۹٦/۱۷
۵	FC	۱٦	۱۰۰	-
٦	FC-2	۸	۸۷/۵	-
۷	FC-201	۳۱	-	۱۰۰
۸	FC-301	۱۷	-	۱۰۰
۹	FC-220	۱۷	-	۱۰۰
۱۰	FC-221	۵	-	۱۰۰
۱۱	HM1990	۱۰	۹۰	-
۱۲	فلورس	۹	۱۰۰	-
۱۳	دوروتی	۱۰	۱۰۰	-
۱٤	لاتیتیا	۷	۷۱/٤۲	-
۱۵	جام و زرقان	۱۳	٤۸/٦۱	-
۱٦	بیریجیتا	۳٤	۱۰۰	۱۰۰
۱۷	رجینا	۷	۱۰۰	-
۱۸	رسول	۲۳	-	۹۱/۳۰
۱۹	شیرین	۸	۱۰۰	-
۲۰	میانگین ارقام حساس	۳۸	۱۰۰	۹۱/۳۰

منابع

۱- خواجه‌پور، م. ر. ۱۳۸٦. گیاهان صنعتی، جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان.

2. Amiri, R., Moghaddam, M., Mesbah, M., Sadeghian, S.Y., Ghannadha, M.R. & Izadpanah, K. 2003a. The inheritance of resistance to beet nectoric yellow vein virus (BNYVV) in B. Vulgaris subsp. Maritime, accession WB42: Statistical comparisons with Holly-1-4. Euphytica 132:363-373.

3. Barzen E, Stahl R, fuchs E, Borchardt DC, Salamini F 1997. Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet Rr1 allele conferring resistance to rhizomania. Mol Breed 3:231-238

4. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.

5. Dellaporta sl, wood J Hicks JB (1983), A plant DNA minipreparation versionii . Plant molecular Biology reporter . 1: 19-21.

6. Scholten, O.E., Klein- Lankhorst RM, Esselink DG, De Bock T.S.M. & Lange. W. 1997. 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 94:123-130.

Validation and repeatability of RAPD repulsion molecular marker linked to rhizomania resistance genes in sugar beet

Oroujalian Samane [1,2*], Norouzi Peyman[2] , Bihamta Mohammadreza[3], Mahmoudi Seyyed Bagher[2], nourkhalaj kiumars[1], karimi afshar asash[1]
1. Karaj Islamic Azad University – Karaj/Iran (KIAU)
2.Sugar Beet Seed Institute
3. University of Tehran, Faculty of Agriculture and Nature Resources
*samaneoroujalian@yahoo.com

Abstract
In order to identify molecular markers linked to rhizomania resitance gene, one segregating population F2 was used. In this study, several random tenmer primers as single and pair combinations were used for RAPD analysis based on bulked segregant analysis onto resistant and susceptible DNA bulks. . some pair primers produced polymorphism in DNA bulks. Then, these pair primers were analysed on bulk individuals DNA and selected ones analysed on F_2 population individuals. Then, the markers were evaluated using the frequency of recombinant plants method for estimating distance between the markers and Rz1 gene. Among the markers, a marker was identified about 14cM apart from resistance gene.then in order to confirmation and repetition of the presence of a repulsion molecular marker This investigation was performed in several eugenic suger beet masses and lines. . For this reason, the intended seed genotypes have been cultivated in greenhouse and the –month plants were transferred to the flowerpots containing agricultural contaminated soil with rhizomania. Remaining in the contaminated soil for two months, contaminated plants were taken out and their root and leaves were sampled separately. The samples roots were used in elisa test to determine the amount of contamination with rhizomania. The leave samples were used to determine the genotype of those plants with a repulsion molecular marker in a molecular test. The elisa results were ciassified as resistant, sensibie and tolerant. Marker results were graded as presence or absence. Then comparing elisa results and molecular test, it was shown that the results of both examinations were about 95 percent in harmony. Therefore in order to develop the statistic projects, the above-mentioned marker, is of great importance in molecular selection of the plants resistant to rhizomania.
Keywords: Sugar beet, Rhizomania, Molecular markers, RAPD