

B.v. subsp.vulgaris × *B.v. subsp. maritima* RAPD

Study of segregation distortion in the genes controlling hypocotyl and flowering stem pigmentation, resistance to rhizomania and RAPD markers in *B.v. subsp. vulgaris* × *B.v. subsp. maritima* crosses

رضا امیری^۱، محمود مصباح^۲، محمد مقدم^۳، سید یعقوب صادقیان^۴ و محمد رضا قنادها^۵

(*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) WB42

(*B. vulgaris*. subsp. *vulgaris*)

BC₁ F₂ F₁

RAPD

RAPD

maritima

B. vulgaris × *B. vulgaris*

B. vulgaris × *B. maritima*

B.vulgaris. ssp. *vulgaris* × *B. vulgaris*. subsp. *maritima*

:

.RAPD

ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بوده (Biancardi et al., 2002; Desplanque et al., 1999; Lewellen et al., 1987) و حامل ژن‌های سودمند زیادی برای مقاومت به ریزومانیا، مانند منبع WB42 (امیری و مصباح، ۱۳۸۱؛ Biancardi et al., 2002; Doney and Whitney, 1995; Lewellen et al., 1987)، پوسیدگی ریشه اروینیائی (Erwinia root rot)، مگس ریشه چغندر قند

زیر گونه ماریتیما (*maritima*) از اهمیت ویژه‌ای در اصلاح چغندر قند برخوردار می‌باشد. این زیر گونه حاوی نمونه‌های وحشی مختلفی با نام چغندر دریائی یا ساحلی (sea beet) می‌باشد که به طور طبیعی از نواحی ساحلی اروپا تا روسیه و هند پراکنده می‌باشد (Van Dijken, 2001). این زیر گونه دارای تنوع

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۳/۲/۱۰

۲ و ۴- دانشجویان پژوهش، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند
۵- دانشیار دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۲/۱۴

۱- عضو هیأت علمی، مؤسسه تحقیقات چغندر قند- کرج
۳- استاد دانشگاه تبریز

(root maggot)، بیماری لکمه برگگی (Doney and Whitney, 1990)، سفیدک سطحی (Whitney, 1989) و تحمل به قارچ *P. betae* (امیری و مصباح، ۱۳۸۱) می باشد. با توجه به سهولت تلاقی این زیر گونه با زیر گونه ولگاریس (*vulgaris*)، به راحتی می توان از آن در اصلاح چغندر قند استفاده نمود (امیری و مصباح، ۱۳۸۱).

استفاده از تلاقی گیاهان مقاوم و حساس به یک بیماری، روش معمول مطالعه نحوه توارث ژنتیک مقاومت و تعیین تعداد ژن های مقاوم به بیماری می باشد. شولتن و همکاران (Scholten et al., 1996) نمونه مقاوم WB42 را با چغندر باغی (red table beet) تلاقی داده و جمعیت های F_2 و BC_1 را تهیه نمودند. ارزیابی بوته های جمعیت های در حال تفکیک با استفاده از آزمون گلخانه ای و اندازه گیری غلظت ویروس در ریشه چه گیاهچه ها با روش الایزا (ELISA)، امکان تعیین تعداد ژن های مقاوم به ریزومانیا را در منبع WB42 فراهم نمود. به طوری که فرض وجود یک یا دو ژن غالب و فرض پیوستگی بین دو ژن غالب برای مقاومت به ریزومانیا در منبع WB42 رد شد. دو فرض دیگر، یعنی کنترل مقاومت به ریزومانیا با دو ژن مکمل یا انحراف تفرق (Segregation distortion) یک یا تعداد بیشتری ژن بزرگ - اثر با نتایج مشاهده شده سازگار بود. شولتن و همکاران (Scholten et al., 1996) اظهار داشتند که توارث مقاومت به ویروس ها بر اساس فرض اول (دو ژن مکمل) به ندرت گزارش شده است. بنابر این به نظر می رسد که فرضیه پیشنهادی دوم (انحراف تفرق یک یا تعداد بیشتری ژن بزرگ - اثر) برای مقاومت به ریزومانیا در منبع WB42 موجه تر باشد (Scholten et al., 1996). از طرف دیگر، شولتن و همکاران (Scholten et al., 1999) در تلاقی WB42 با Holly (منبع دیگر مقاوم به ریزومانیا و از زیر گونه ولگاریس) انحراف تفرق مشاهده نمودند، در این مطالعه نیز امکان تعیین تعداد ژن های مقاوم به ریزومانیا

در منبع WB42 میسر نشد. به طوری که، نسبت های مشاهده شده در برخی از جمعیت های F_2 و BC_1 حاصل از تلاقی این دو والد مقاوم، با یک ژن غالب در WB42 مطابقت نداشت، در حالی که در برخی از گیاهان F_1 وجود ژن غالب دوم برای WB42 نیز قابل رد کردن نبود. از طرف دیگر، در سایر گیاهان F_1 وجود ژن غالب دوم برای WB42 نه قابل رد کردن بود و نه قابل تأیید. شولتن و همکاران (Scholten et al., 1999) علت عدم مشاهده انحراف تفرق را در تلاقی های بین WB42 و Holly، احتمال شباهت اجدادی این دو والد دانستند. با این وجود، در مطالعه نشانگرهای ایزوزایم یا مورفولوژیک نیز که با استفاده از تلاقی بین واریته های مختلف چغندر قند انجام گرفت، انحراف تفرق گزارش شده است (Wagner et al., 1992; Wagner and Wricke, 1991).

موضوع انحراف تفرق در تهیه نقشه های پیوستگی و شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن ها از اهمیت خاصی برخوردار است (Hackatt and Broadfoot, 2003) و دارای کاربردهای عملی زیادی می باشد (Subudhi and Huang, 2002). با توجه به این که تهیه نقشه های پیوستگی بر اساس آزمون نسبت های مورد انتظار مندلی صورت می گیرد و پیوستگی فیزیکی بین دو مکان ژنی و نیز انحراف تفرق در هر یک از مکان های ژنی از عوامل انحراف از نسبت های مندلی می باشد، این مسئله باید از پیوستگی فیزیکی ژن ها متمایز گردد (Hackatt and Broadfoot, 2003). در صورتی که انحراف تفرق از علت ژنتیکی بر خوردار باشد، فراوانی سایر ژن های نزدیک به محل ژنی که در آن انحراف تفرق مشاهده شده است، نیز تحت تأثیر قرار گرفته و این موضوع فراوانی نو ترکیبی را در تلاقی خاص مورد نظر تغییر خواهد داد (Subudhi and Huang, 2002). با وجود این، تاکنون در تهیه نقشه های پیوستگی به این موضوع توجه کمی شده است (Hackatt and Broadfoot, 2003). در برخی

در میزان انحراف تفرق در تلاقی‌های ماریتیمای × ولگاریس دارد یا خیر؟

در این مطالعه از چغندر وحشی WB42 (*B.v. subsp. maritima*) و با محور زیر لپه و ساقه گلدهنده قرمز استفاده گردید. ابتدا در سال اول والد WB42 به صورت جفتی و در زیر پوشش (cage) با رگه‌های نر عقیم چغندر قند (رگه ۲۶۱) و چغندر یک ساله تلاقی داده شد. رنگ محور زیر لپه و ساقه گلدهنده رگه‌های ۲۶۱ و چغندر یک ساله سبز بود. در سال دوم، گیاهان F_1 مقاوم برای تولید جمعیت‌های F_2 در بلوک‌های ایزوله خود گشن شدند. هم‌چنین، برای تهیه جمعیت‌های BC_1 ، گیاهان F_1 مقاوم با گیاهان نر عقیم رگه ۲۶۱ و چغندر یک ساله (با محور زیر لپه و ساقه گلدهنده سبز) تلاقی داده شدند.

بذور F_1 و جمعیت‌های در حال تفکیک در گلخانه و در ماسه استریل کشت گردیده و در مرحله چهار تا شش برگی رنگ محور زیر لپه گیاهان بررسی شد. برای ارزیابی رنگ ساقه گلدهنده، فقط گیاهان جمعیت‌های حاصل از تلاقی WB42 با والد یک ساله (به علت یک ساله بودن و عدم نیاز به سرمادهی) به مزرعه منتقل و پس از ساقه‌دهی گیاهان رنگ ساقه گلدهنده تک بوته‌ها ارزیابی شد.

آزمون گلخانه‌ای مشابه روش پائل و همکاران (Paul et al., 1992) بود، ولی نسبت خاک آلوده به ماسه استریل ۷:۳ در نظر گرفته شد. کلیه گلدان‌ها هفته‌ای دو بار با محلول غذائی ۰/۲ رقت هاگلند و آرنون (Haogland and Arnon, 1950) آبیاری شدند و دمای گلخانه در بین ۱۷ (شب) و ۲۵ درجه سانتیگراد (روز) تنظیم گردید. پس از طی شدن دوره آزمون، از ریشه‌چه گیاهان برای آزمون الایزا (ELISA) استفاده گردید. با

جمعیت‌های دابل هاپلوئید جو انحراف تفرق مشاهده شده است که ژن‌های مؤثر بر زنده ماندن ریز نمونه‌ها در کشت بساک یا میکروسپور به عنوان عامل انحراف پیوسته شش شده است (Manninen, 2000; Zivy et al., 1992). در مطالعه یوفوف و رایک (Uphoff and Wricke, 1995) برای تهیه نقشه پیوستگی چغندر قند، در حدود ۲۳ درصد از نشانگرهای RAPD مورد شناسائی، انحراف تفرق نشان دادند. اکثر این نشانگرها در انتهای گروه‌های پیوستگی قرار داشتند. در مطالعه پیلن و همکاران (Pillen et al., 1992) با استفاده از نشانگرهای RFLP، میزان انحراف تفرق در حدود ۱۵/۴ درصد بود. آن‌ها استدلال نمودند که این موضوع احتمالاً در اثر وجود مکان‌های ژنی کشنده پیوسته با این نشانگرها و لذا انتخاب گامتی می‌باشد. در مطالعه پیلن و همکاران (Pillen et al., 1993) نشانگرهای RFLP برخوردار از انحراف تفرق بر روی گروه‌های پیوستگی ۱، ۵، ۶ و ۸ قرار داشتند که بر روی هر یک از این گروه‌ها حداقل یک ژن کشنده شناسائی گردید.

هدف این پژوهش، بررسی انحراف تفرق در تلاقی چغندر وحشی WB42 (از زیر گونه ماریتیمای مقاوم به ریزومانیا) با رگه‌های چغندر قند حساس به ریزومانیا (از زیر گونه ولگاریس) با استفاده از مکان‌های ژنی کنترل کننده رنگ محور زیر لپه، رنگ ساقه گلدهنده، مقاومت به ریزومانیا و نشانگرهای RAPD بود. با توجه به روشن نبودن تعداد ژن‌های مقاوم به ریزومانیا در منبع WB42، این مطالعه با هدف بررسی دقیق نحوه تفکیک گیاهان مقاوم و حساس در جمعیت‌های در حال تفکیک حاصل از تلاقی ماریتیمای × ولگاریس و میزان انحراف تفرق در این جمعیت‌ها انجام گرفت. ضمن این که از دو مکان ژنی رنگ محور زیر لپه و رنگ ساقه گلدهنده همراه با نشانگرهای RAPD برای تفسیر بهتر نتایج حاصل استفاده گردید. به عبارت دیگر، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آیا زمینه ژنتیکی ماریتیمای تأثیری فوق‌العاده

DNA ی والد WB42 و رگه ۲۶۱ با استفاده از ۲۸۲ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی (۱۸۲) آغازگر از کیت شرکت Advanced Biotechnology انگلستان و ۱۰۰ آغازگر از کیت UBC آمریکا) ارزیابی شدند. از آغازگرهایی که بین والدین چند شکلی نشان دادند، برای تعیین فنوتیپ نشانگر در تک بوته‌های جمعیت F₂ حاصل از تلاقی WB42 با ۲۶۱ استفاده گردید. واکنش PCR به شرح زیر بود:

روش معمول DAS-ELISA مطابق کلارک و آدامز (Clark and Adams, 1977)، غلظت ویروس در ریشه‌چه گیاهان اندازه‌گیری شد. آنتی سرم و کنترل مثبت مربوط به شرکت بیوربا (Bioreba, AG, Switzerland) بود. کلیه نمونه‌ها با دو تکرار (یا بیشتر) تجزیه شدند. واکنش آنزیمی با Labsystems, Multiskan EX 355 در ۴۰۵ nm خوانده شد. آستانه معادل دو برابر میانگین جذب نمونه‌های سالم در هر پلیت (۲ × H) در نظر گرفته شد.

RAPD

استخراج DNA به روش واندر بیک و همکاران (Van der Beek et al., 1992) انجام شد. سپس نمونه‌های

غلظت نهائی	اجزاء واکنش
۱/۵ mM	MgCl ₂
۰/۲ mM	DNTPs
۱ X	Reaction Buffer ۱۰X
۱ Unit	Taq. Polymerase
۷/۵ pmol	Primer
۵۰ ng	DNA
—	d.d.H ₂ O
۲۵ µl	جمع واکنش

شامل ۰/۲۵ درصد برموفنیل بلو و ۴۰ درصد (W/V) ساکارز بود. ژل الکتروفورز به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱ µg/ml اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر رنگ زدائی گردید.

مقایسه نسبت‌های مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت‌های در حال تفکیک با استفاده از آزمون کای اسکور تصحیح شده یتز (Yates) با یک درجه آزادی انجام شد (Steel and Torrie, 1980).

که آنزیم Taq. Polymerase و dNTPs از شرکت سیناژن خریداری شده و بافر واکنش با استفاده از مواد MERCK در آزمایشگاه تهیه گردید. هم‌چنین، ترکیب بافر واکنش PCR شامل:

750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween-20 بود. واکنش PCR در دستگاه Biometra T3 و با برنامه زیر انجام شد: یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۴°C، ۴۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در ۳۴/۵°C و ۸۰ ثانیه در ۷۲°C و یک مرحله گسترش نهایی (۱۰ دقیقه در ۷۲°C). محصول واکنش PCR به مقدار شش میکرولیتر از هر نمونه در هر چاهک بر روی ژل آگار یک درصد و تحت شرایط جداسازی گردید. بافر ۶× بارگیری (loading) ۲/۵ v/cm

در تمامی گیاهان F_1 حاصل از تلاقی WB42 با رنگه ۲۶۱ و چغندر یک ساله رنگ محور زیر لپه قرمز بود. بنابراین، غالب بودن رنگ قرمز محور زیر لپه تأیید شد (Barzen et al., 1992; Wolyn and Gabelman, 1989). همین نتیجه در مورد رنگ ساقه گلدهنده گیاهان F_1 نیز مشاهده گردید. لذا، نتیجه‌گیری شد که رنگ ساقه گلدهنده نیز به صورت غالب کنترل می‌شود. نحوه تفکیک رنگ محور زیر لپه و رنگ ساقه گلدهنده در جمعیت‌های F_2 و BC_1 در جدول ۱ ارائه شده است. همان طوری که ملاحظه می‌گردد در کلیه جمعیت‌های F_2 و BC_1 برای هر دو مکان ژنی مورد نظر، نسبت‌های مشاهده شده به ترتیب با نسبت‌های ۳:۱ و ۱:۱ مطابقت دارد، زیرا آماره کای اسکور تصحیح شده برای هیچ یک از جمعیت‌ها معنی‌دار نبود ($P \leq 0.05$). بنابراین، در تفکیک این دو مکان ژنی در تلاقی ماریتیمای ولگاریس انحرافی مشاهده نگردید. اگرچه محل کروموزومی ژن رنگ ساقه گلدهنده مشخص نمی‌باشد، اما ژن رنگ محور زیر لپه بر روی کروموزوم شماره ۲ چغندر قند گزارش شده است (Francis and Asher, 2000; Schondelmaier and Jung, 1997; Barzen et al., 1995). با توجه به این که، تاکنون یک ژن کشته نشده نیز بر روی کروموزوم ۲ چغندر قند گزارش شده (Francis and Asher, 2000; Schondelmaier and Jung, 1997)، نتیجه حاضر حداقل بیانگر فاصله قابل توجه این ژن با مکان ژنی رنگ محور زیر لپه می‌باشد. زیرا، انتخاب گامتی و لذا تغییر شایستگی زیگوت‌ها برای مکان ژنی رنگ محور زیر لپه مشاهده نشده و این موضوع منجر به تفکیک مندلی این صفت در جمعیت‌های در حال تفکیک حاصل شده است. علاوه بر این، زمینه ژنتیکی زیر گونه ماریتیمای تأثیر خاصی بر روی نحوه تفکیک این دو مکان ژنی در تلاقی ماریتیمای ولگاریس ندارد.

نتایج ارزیابی مقاومت به ریزومانیا در جمعیت‌های F_1 ، F_2 و BC_1 در جدول ۲ ارائه شده است. همان طوری که مشاهده می‌شود در دو جمعیت F_1 (۷۱-۸۵- F_1 و ۷۲- F_1 - A_2)، گیاهان حساس به ریزومانیا نیز وجود دارند. از آن جایی که تلاقی‌ها به صورت جفتی انجام شده بود، امکان تعیین ژنوتیپ والدین گرده‌دهنده (WB42) وجود داشت. با توجه به معنی‌دار نبودن آماره کای اسکور تصحیح شده برای نسبت ۱:۱ در این دو جمعیت (جدول ۲) نتیجه‌گیری گردید که ژنوتیپ بوته‌های ۷۱ و ۷۲ (به ترتیب والدین پدری برای تهیه جمعیت‌های ۷۱-۸۵- F_1 و ۷۲- F_1 - A_2) به صورت هتروزیگوت بوده است. به همین ترتیب ژنوتیپ بوته‌های ۷۶، ۸۰، ۱۱۱ و ۱۱۲ (به ترتیب والدین پدری برای تهیه جمعیت‌های ۷۶-۹۳- F_1 ، ۸۰-۹۹- F_1 ، ۱۱۱- A_1 - F_1 و ۱۱۲- A_2 - F_1) به صورت هموزیگوت غالب تعیین گردید. زیرا، کلیه گیاهان F_1 حاصل از تلاقی این بوته‌ها با بوته‌های والدین حساس، مقاوم به ریزومانیا بودند (جدول ۲). از طرف دیگر، نسبت‌های مشاهده شده در جمعیت‌های F_2 و BC_1 با فرض وجود یک ژن غالب مطابقت داشته و آماره کای اسکور تصحیح شده معنی‌دار نبود (جدول ۲). بنابراین، هیچ گونه انحراف تفرق برای مقاومت به ریزومانیا مشاهده نگردید. لولن و بیانکاردی (Lewellen and Biancardi, 1990) اظهار داشتند که در شرایط گلخانه‌ای از توسعه نرمال ریشه ممانعت به عمل آمده و لذا احتمال بروز تغییرات در دینامیک آلودگی وجود دارد. علاوه بر این، مقاومت به ریزومانیا ممکن است تحت تأثیر ژن‌های کوچک اثر یا تغییرات محیطی قرار گیرد (Scholten et al., 1997; Lewellen and Biancardi, 1990). بنابراین، تعداد نمونه آزمون شده در هر جمعیت برای حصول نتایج دقیق از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. در مطالعه حاضر به طور متوسط ۱۳۲ گیاه برای بررسی نسبت‌های مشاهده شده در جمعیت‌های در حال تفکیک ارزیابی گردید. در

حالی که، در مطالعه شولتن و همکاران (Scholten et al., 1996) به طور متوسط فقط ۶۰ گیاه برای این موضوع انتخاب شده بود. جالب توجه است که در مطالعه حاضر نیز در جمعیتی که تعداد بوته کمتری مورد مطالعه قرار گرفت (جمعیت ۷۱-۸۵-BC₁)، مقدار آماره کای اسکور تصحیح شده بالاتر از سایر جمعیت‌ها بود. در مطالعه وگنر و رایک (Wagner and Wricke, 1991) و وگنر و همکاران (Wagner et al., 1992) نیز تعداد گیاهان مطالعه شده کم بود (به ترتیب ۵۰ و بین ۵۰ و ۱۰۰ گیاه). از طرف دیگر، احتمال دارد که در مطالعه شولتن و همکاران (Scholten et al., 1996) مقاومت به ریزومانیا تحت تأثیر زمینه ژنتیکی چغندر باغی قرار گرفته باشد. افزون بر این، دخالت ژن‌های کشنده در این موضوع نیز منتفی به نظر می‌رسد. زیرا ژن مقاوم به ریزومانیا در منبع WB42 بر روی کروموزوم شماره ۳ چغندر قند قرار دارد (Francis and Asher, 2000; Francis, 1999) و تا کنون هیچ ژن کشنده‌ای بر روی این کروموزوم گزارش نشده است (Francis and Asher, 2000; Schondelmaier and Jung, 1997).

RAPD

نحوه تفکیک ۲۴ نشانگر RAPD در جمعیت F₂ حاصل از تلاقی WB42 با رگه ۲۶۱ در جدول ۳ ارائه شده است. همان طوری که مشاهده می‌شود ۵ نشانگر (حدود ۲۱ درصد) از تفکیک مندلی انحراف نشان می‌دهند ($P \leq 0.01$). این نتیجه اندکی کمتر از گزارش یوفوف و ریک (Uphoff and Wricke, 1995) می‌باشد که میزان انحراف تفرق نشانگرهای RAPD را در تلاقی‌های ولگاریس × ولگاریس در حدود ۲۳ درصد گزارش کردند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که انحراف تفرق مشاهده شده برای نشانگرهای RAPD به طور طبیعی در ژنوم چغندر وجود داشته و زمینه ژنتیکی ماریتیمای نقشی در افزایش غیر معمول آن ندارد. این موضوع احتمالاً ناشی از حذف انتخابی گامت‌های نر در

نتیجه عقیمی دانه‌های گرده یا خود ناسازگاری (Subudhi and Huang, 2002; Wagner et al., 1992)، حذف انتخابی گامت‌های ماده (Subudhi and Huang, 2002) و یا در نتیجه تفاوت‌های شایستگی بین زیگوت‌ها می‌باشد (Wagner et al., 1992). باید توجه کرد که در ژنوم چغندر قند چند ژن کشنده به ویژه بر روی کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۵ (Francis and Asher, 2000; Schondelmaier and Jung, 1997) یا گروه‌های پیوستگی ۱، ۵، ۶ و ۸ (Pillen et al., 1993) گزارش شده است و در ضمن مکان کروموزومی نشانگرهای RAPD نامشخص می‌باشد (Virk et al., 2000). از طرف دیگر، از آن جایی که مطالعه حاضر مقدمه مطالعه بعدی جهت تعیین نقشه نشانگرهای RAPD و شناسایی نشانگر(های) پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در منبع WB42 می‌باشد؛ بنابراین، برای افزایش دقت و واقعی بودن برآورد پیوستگی بین نشانگرها (Hackatt and Broadfoot, 2003; Subudhi and Huang, 2002)، بهتر است ۵ نشانگر دارای انحراف از تفکیک مندلی از تجزیه‌های بعدی حذف شوند. از بین این ۵ نشانگر، یک نشانگر (۵۷۰-۱۶-AB₂) در والد ۲۶۱ (حساس) وجود داشت ولی در والد WB42 (مقاوم) مشاهده نگردید. بر این اساس، روشن است که در جمعیت F₂، گیاهان حساس فاقد نشانگر به عنوان گیاهان نوترکیب به حساب می‌آیند. با بررسی گیاهان واجد یا فاقد این نشانگر در جمعیت F₂ مشخص گردید که ۱۴ گیاه فاقد آن حساس به ریزومانیا می‌باشند. بنابراین، حداقل حدود ۲۳ درصد از افراد (۲۲۶/۰ = ۱۴:۶۲)، برای این نشانگر نوترکیب بودند. با در نظر گرفتن فراوانی نوترکیبی روی کروموزوم همولوگ (حامل ژن مقاومت به ریزومانیا) فراوانی افراد نوترکیب معادل ۴۶ درصد (۲۳×۲) به دست آمد. ضمن این که باید توجه داشت که تعداد گیاهان ارزیابی شده برای این

نشانگر کم بودند و با افزایش تعداد گیاهان امکان افزایش فراوانی افراد نوترکیب وجود داشت. لذا، نتیجه‌گیری شد که این نشانگر یا روی کروموزوم دیگری غیر از کروموزوم شماره ۳ (محل ژن مقاومت به جدول ۱- نسبت‌های مورد انتظار و مشاهده شده در جمعیت‌های در حال تفکیک WB42 برای صفات رنگ محور زیر لپه و رنگ ساقه گلدهنده

Table 1. Expected and observed ratios in segregating populations of WB42 for hypocotyl and flowering stem pigmentation

کای اسکور تصحیح شده χ^2 Adjusted	نسبت‌های مشاهده شده Observed ratios	نسبت‌های مورد انتظار Expected ratios	تعداد No.	شماره تلاقی Cross number	جمعیت‌ها Populations
رنگ محور زیر لپه Hypocotyl pigmentation					
0.223 ^{ns}	0.738:0.262	3:1	382	F ₂ -93-76	F ₂ (261×WB42)
0.268 ^{ns}	0.519:0.481	1:1	239	BC ₁ -93-76	BC ₁ (261×WB42)
2.396 ^{ns}	0.684:0.316	3:1	117	F ₂ -A2-111	F ₂ (Annual×WB42)
0.720 ^{ns}	0.464:0.536	1:1	168	BC ₁ -A2-111	BC ₁ (Annual×WB42)
رنگ ساقه گلدهنده Flowering stem pigmentation					
3.423 ^{ns}	0.648:0.352	3:1	71	F ₂ -A2-111	F ₂ (Annual×WB42)
0.085 ^{ns}	0.487:0.513	1:1	189	BC ₁ -A2-111	BC ₁ (Annual×WB42)

ns: Non significant

ns: غیرمعنی دار

جدول ۲- نسبت‌های مورد انتظار و مشاهده شده در جمعیت‌های WB42 برای مقاومت به ریزومانیا

Table 1. Expected and observed ratios in families of WB42 for resistance to rhizomania

کای اسکور تصحیح شده χ^2 Adjusted	نسبت‌های مشاهده شده Observed ratios	نسبت‌های مورد انتظار Expected ratios	تعداد No.	شماره تلاقی Cross number	جمعیت‌ها Populations
0.000 ^{ns}	0.512:0.488	1:1	43	F ₁ -85-71	F ₁ (261×WB42)
0.000 ^{ns}	1:0	1:0	31	F ₁ -93-76	F ₁ (261×WB42)
0.000 ^{ns}	1:0	1:0	26	F ₁ -99-80	F ₁ (261×WB42)
0.083 ^{ns}	0.583:0.417	1:1	12	F ₁ -A2-72	F ₁ (Annual×WB42)
0.000 ^{ns}	1:0	1:0	22	F ₁ -A1-111	F ₁ (Annual×WB42)
0.000 ^{ns}	1:0	1:0	17	F ₁ -A2-112	F ₁ (Annual×WB42)
2.541 ^{ns}	0.694:0.306	3:1	170	F ₂ -93-76	F ₂ (261×WB42)
0.579 ^{ns}	0.464:0.536	1:1	140	BC ₁ -93-76	BC ₁ (261×WB42)
3.322 ^{ns}	0.627:0.373	1:1	59	BC ₁ -85-71	BC ₁ (261×WB42)
0.449 ^{ns}	0.725:0.275	3:1	167	F ₂ -A2-111	F ₂ (Annual×WB42)

ns: Non significant

ns: غیرمعنی دار

مشاهده نشدند. بنابراین، برای این ۴ نشانگر، گیاهان حساس دارای نشانگر و گیاهان مقاوم فاقد آن، گیاهان نوترکیب بودند. با بررسی جمعیت F_2 برای نشانگرهای جدول ۳- نسبت‌های مورد انتظار و مشاهده شده برای نشانگرهای RAPD در جمعیت F_2 ($261 \times WB42$)

Table 1. Expected and observed ratios of RAPD markers in F_2 population ($261 \times WB42$)

نشانگر Marker	تعداد بوته No.	نسبت های مورد انتظار Expected ratios	نسبت های مشاهده شده Observed ratios	کای اسکوور تصحیح شده $\chi^2_{Adjusted}$
AM2-1800	140	3:1	0.764:0.236	0.086 ^{ns}
AM2-1650	140	3:1	0.686:0.314	2.752 ^{ns}
AM2-950	140	3:1	0.821:0.179	3.438 ^{ns}
AM2-380	140	3:1	0.693:0.307	2.143 ^{ns}
AB3-3-710	112	3:1	0.732:0.268	0.107 ^{ns}
AB3-3-580	112	3:1	0.545:0.455	24.107 ^{**}
AB9-3-800	101	3:1	0.733:0.267	0.083 ^{ns}
AB9-3-560	101	3:1	0.762:0.238	0.030 ^{ns}
AB9-3-1140	101	3:1	0.604:0.396	10.723 ^{**}
AB6-7-570	86	3:1	0.733:0.267	0.062 ^{ns}
AB6-7-1000	86	3:1	0.500:0.500	27.349 ^{**}
AB1-4-680	87	3:1	0.747:0.253	0.000 ^{ns}
AB1-4-710	87	3:1	0.632:0.368	5.828 [*]
AB1-4-1250	87	3:1	0.713:0.287	0.000 ^{ns}
UBC238-450	86	3:1	0.791:0.209	0.558 ^{ns}
UBC238-850	86	3:1	0.686:0.314	1.550 ^{ns}
AB9-18-2300	50	3:1	0.700:0.300	0.427 ^{ns}
AB9-18-400	50	3:1	0.460:0.540	22.752 ^{**}
AB9-18-550	33	3:1	0.848:0.152	1.222 ^{ns}
AB2-16-350	44	3:1	0.750:0.250	0.000 ^{ns}
AB2-16-570	62	3:1	0.581:0.419	8.602 ^{**}
AB2-16-1300	62	3:1	0.677:0.323	1.376 ^{ns}
AB5-9-840	33	3:1	0.727:0.273	0.010 ^{ns}
AB5-9-1540	33	3:1	0.636:0.364	1.707 ^{ns}

ns, *, ** : به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and ** : Non significant and significnat at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

RAPD حتی اندکی کمتر از تلاقی‌های ولگاریس × ولگاریس بود. بنابراین، بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که زمینه ژنتیکی ماریتیمای در افزایش انحراف تفرق در تلاقی‌های ماریتیمای × ولگاریس در مقایسه با تلاقی‌های ولگاریس × ولگاریس تأثیری ندارد.

نتیجه‌گیری قبلی تقریباً در مورد این ۴ نشانگر نیز صادق بود.

به طوری که مشاهده شد در مورد ژن‌های رنگ محصور زیر لپه، رنگ ساقه گل‌دهنده و مقاومت به ریزومانیا هیچ گونه انحرافی در تفکیک مندلی در تلاقی‌های ماریتیمای × ولگاریس مشاهده نشده و میزان انحراف تفرق مشاهده شده برای نشانگرهای

بوجاری بذور، خانم‌ها مهندس نسرين ياوري و مهرانگيز بيگدلي و آقايمان بنی صدر و مير سليمي به خاطر همکاري در آزمون گلخانه‌اي و آقايمان مهندس دارابي و مهندس اشرف منصوري به خاطر کمک در يادداشت برداري صفت رنگ ساقه گلدهنده قدرداني مي‌گردد.

بدین وسیله از آقایان دکتر ذبیح اله رنجی و مهندس مرتضی توده فلاح به خاطر در اختیار قرار دادن امکانات لازم برای انجام تلاقی‌ها، ارزیابی گلخانه‌ای و آزمون الایزا، آقایان مهندس سعید واحدی، رستم علیزاده و منوچهر کوهستانی به خاطر همکاری در انجام تلاقی‌ها و

References

- امیری، ر. و م. مصباح. ۱۳۸۱. پیشرفت‌های ژنتیکی در زمینه اصلاح چغندر قند برای مقاومت به ریزومانیا در ایران. مجموعه مقالات بیست و چهارمین دوره سمینارهای کارخانه‌های قند و شکر ایران. مشهد، مرکز بررسی و تحقیق و آموزش صنایع قند ایران، صفحات ۲۸۳-۲۷۲.
- Barzen, E., W. Meckelke, E. Ritter, J. F. Seitzer & F. Salamini. 1992. RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogermmy and hypocotyl colour. *Plant J.* **2**: 601-611.
- Barzen, E., W. Meckelke, E. Ritter, E. Schultekappert & F. Salamini. 1995. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 189-193.
- Biancardi, E., R. T. Lewellen, M. De Biaggi, A. W. Erichsen & P. Stevanato. 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* **127**: 383-397.
- Clark, M. F. & A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483.
- Desplanque, B., P. Boudry, K. Broomberg, P. Saumitou-Laprade, J. Cuguen & H. Van Dijk. 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 1194-1201.
- Doney, D. L. & E. D. Whitney. 1990. Genetic enhancement in *Beta* for disease resistance using wild relatives: a strong case for the value of genetic conservation. *Economic Botany* **44**: 445-451.
- Francis, S. A. 1999. Using molecular markers to understand rhizomania and powdery mildew resistance. *British Sugar Beet Review* **67**: 16-19.
- Francis, S. A. & M. J. C. Asher. 2000. Exploiting novel sources of disease resistance in *Beta* germplasm using molecular markers. *J. Sugar Beet Research* **37**: 89-95.
- Hackett, C. A. & L. B. Broadfoot. 2003. Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. *Heredity* **90**: 33-38.
- Hoagland, D. R. & D. I. Arnon. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.*, 347. 32p.

- Lewellen, R. T. & E. Biancardi. 1990. Breeding and performance of rhizomania resistant sugar beet. Proceedings of the 53rd IIRB Congress, Brussels: 69-87.
- Lewellen, R. T., I.O. Skoyen & A. W. Erichsen. 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: evaluation of host-plant reaction and selection for and inheritance of resistance. Proceedings of the 50th IIRB Congress, Brussels: 139-156.
- Manninen, O. M. 2000. Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosome 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. **100**: 57-62.
- Paul, H., B. Henken & M. F. J. Alderlieste. 1992. A greenhouse test for screening sugar-beet (*Beta vulgaris*) for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV). Neth. J. Pl. Path. **98**: 65-75.
- Pillen, K., G. Steinruchen, R. G. Herrmann & C. Jung. 1993. An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and the restorer gene x. Plant Breed. **111**: 265-272.
- Pillen, K., G. Steinruchen, G. Wricke, R. G. Herrmann & C. Jung. 1992. A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. **84**: 129-135.
- Scholten, O. E., Th. S. M. De Bock, R. M. Klein–Lankhorst & W. Lange. 1999. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. Theor. Appl. Genet. **99**: 740-746.
- Scholten, O. E., R. C. Jansen, L. C. Paul Keizer, Th. S. M. De Bock & W. Lange. 1996. Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. Euphytica **91**: 331-339.
- Scholten, O. E., R. M. Klein–Lankhorst, D. G. Esselink, Th. S. M. De Bock & W. Lange. 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.
- Schondelmaier, J. & C. Jung. 1997. Chromosomal assignment of the nine linkage groups of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using primary trisomics. Theor. Appl. Genet. **95**: 590-596.
- Steel, R. G. D. & J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Subudhi, P. K. & N. Huang. 2002. Identification of genes responsible for segregation distortion in a doubled haploid population of rice by using molecular markers. Rice Genetics Newsletters **12**: 239-240.
- Uphoff, H. & G. Wricke. 1995. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris*) based on RAPD markers. Plant Breed. **114**: 355-357.
- Van der Beek, J. G., R. Verkerk, P. Zabel & P. Lindhout. 1992. Mapping strategy for resistance genes in tomato based on RFLPs between cultivars: *cf9* (resistance to *Cladosporium Fulvum*) on chromosome 1. Theor. Appl. Genet. **84**: 106-112.
- Van Dijken, R. 2001. Sugar beet and genetic modification, a literature research on sugar beet and the implications of genetic modification. Utrecht University, P-UB-2001-02. 28 P.

- Virk, P. S., H. J. Newbury, M. T. Jackson & B. V. Ford-Lloyd. 2000. Are mapped markers more useful for assessing genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 607-613.
- Wagner, H. & G. Wricke. 1991. Genetic control of five isozyme systems in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Breed.* **107**: 124-130.
- Wagner, H., W. E. Weber & G. Wricke. 1992. Estimating linkage relationship of isozyme markers and morphological markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including families with distorted segregations. *Plant Breed.* **108**: 89-96.
- Whitney, E. D. 1989. *Beta maritima* as a source of powdery mildew resistance in sugar beet. *Plant Disease* **73**: 487-489.
- Wolyn, D. J. & W. H. Gabelman. 1989. Inheritance of root and petiole pigmentation in red table beet. *J. Heredity* **80**: 33-38.
- Zivy, M., P. Devaux, J. Blaisonneaux, R. Jean & H. Thiellement. 1992. Segregation distortion and linkage studies in microspore-derived double haploid lines of *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.* **83**: 919-924.

Study of segregation distortion in the genes controlling hypocotyl and flowering stem pigmentation, resistance to rhizomania and RAPD markers in

B.v. subsp. vulgaris × *B.v. subsp. maritima* crosses

Beta vulgaris subsp. *vudgaris* × *Beta vulgaris* subsp. *maritima*

R. Amiri¹, M. Mesbah², M. Moghaddam³, S. Y. Sadeghian⁴, M. R. Ghanadha⁵

In this study, a rhizomania resistant wild beet accession, *Beta. vulgaris* subsp. *maritime*, WB42 was crossed in pairs with susceptible male-stirle lines, *Beta. vulgaris* subsp. *vulgaris* and F₁, F₂ and BC₁ populations were obtained. Hypocotyl and flowering stem pigmentation of WB42 were red and those of the susceptible lines were green. Segregation ratio of hypocotyl and flowering stem pigmentation and resistance to rhizomania genes as well as RAPD markers were assessed in segregating populations. No segregation distortion were observed for the genes controlling hypocotyl and flowering stem pigmentation and resistance to rhizomania, in segregating populations. The segregation distortion for RAPD markers in this crosses were lower than the *B. vulgaris* × *B. vulgaris* cross. It is concluded that the genetic background of *B. v. subsp. maritima* doesn't influence the amount of the segregation distortion in *B. v. subsp vulgaris* × *B. v. subsp. maritima* crosses.

Key words: *B.v. subsp. Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* × *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, RAPD markers, Resistance to rhizomania, Segregation distortion

1- Scientific members of Sugar Beet Improvement Institute Karaj, Iran.

2, 4- Research Sugar Beet Seed Improvement Institute.

3- Prof. of Tabriz University.

5- Assoc. Prof., of Tehran University.