شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته به ژن نرعقیمی ژنتیکی در چغندر قند (*Beta vulgaris* L.)

لیلا خدائی[۱]، حشمت الله رحیمیان[۲]، رضا امیری[۳]، محمود مصباح[۴]،
اصغر میرزائی اصل[۵] و سید کمال کاظمی تبار[۶]

چکیده

نرعقیمی ژنتیکی صفتی است که در چغندر قند به وسیله یک جفت آلل مغلوب (aa) کنترل می‌شود. وجود صفت نرعقیمی ژنتیکی در یک رگه یا جمعیت چغندر قند موجب تسهیل در انجام تلاقی‌های لازم در انتقال صفات مهم نظیر مقاومت به بیماری‌ها می‌شود. هم‌چنین با استفاده از نرعقیمی ژنتیکی می‌توان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های تک‌جوانه چغندرقند را افزایش داد. چنانچه صفت نرعقیمی ژنتیکی را بتوان با نشانگرهای مولکولی نشانمند نمود زمان و هزینه‌ای که برای انتقال آن به یک زمینه ژنتیکی دیگر لازم است، به شدت کاهش می‌یابد. در این بررسی، برای نشانمند کردن ژن نرعقیمی ژنتیکی از ۳۰۲ آغازگر RAPD به همراه روش BSA استفاده شد. از مخلوط DNA ۸ گیاه نر بارور و ۸ گیاه نرعقیم از دو جمعیت ۲۳۱ و ۲۶۱ استفاده شد. ابتدا آغازگرها روی توده‌ها آزمون گردید و پس از شناسایی آغازگرهای چند شکل در بین دو توده، این آغازگرها روی تک بوته‌های تشکیل دهنده هر کدام از توده‌ها آزمون شدند. چنانچه در این مرحله هم چند شکلی آغازگر تائید شد، در مرحله بعدی از آن در آزمون بقیه تک بوته‌های دو جمعیت ۲۳۱ و ۲۶۱ استفاده گردید. در پایان ۱۰ نشانگر در جمعیت ۲۳۱ و۶ نشانگر در جمعیت ۲۶۱ شناسایی شد که فاصله آنها از مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی کمتر از ۵۰ سانتی‌مورگان بود. از میان این نشانگرها، نشانگر ناجفت AB ۸-۱۸-۶۰۰r کمترین فاصله را با مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی داشت. این نشانگر فقط ۳ نوترکیبی در جمعیت ۲۳۱ و یک نوترکیبی در جمعیت ۲۶۱ نشان داد، در نتیجه فاصله این نشانگر از مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی در مجموع این دو جمعیت برابر ۵/۳ سانتی‌مورگان برآورد شد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه توده در حال تفرق، چغندرقند، نرعقیمی ژنتیکی، نشانگر RAPD

۱. دانشجوی سابق کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران
۲. استاد بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران
۳. استادیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان
۴. دانشیار پژوهش مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج
۵. دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۶. استادیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) از منابع مهم تأمین ساکارز در دنیا می‌باشد. یکی از عوامل مهم برای افزایش تولید ساکارز در دنیا، تهیه ارقام پر محصول چغندرقند و در درجه اول ارقام هیبرید است. در تهیه ارقام هیبرید به مکانیسمی برای کنترل گرده افشانی نیاز است. این مکانیسم در بسیاری از گیاهان زراعی توسط نرعقیمی فراهم گردیده است (۱).

عدم تولید بساک یا دانه‌های گرده فعال، نرعقیمی نامیده می‌شود. نرعقیمی می‌تواند ژنتیکی (Genetic male sterility)، سیتوپلاسمی (Cytoplasmic male sterility) و یا ژنتیکی – سیتوپلاسمی (Genetic- cytoplasmic male sterility) باشد (۲). نرعقیمی ژنتیکی چغندرقند برای اولین بار توسط آون (Owen) در سال ۱۹۵۲ شناسایی شد. وی این نوع نرعقیمی را به یک ژن هسته‌ای مغلوب نسبت داد. این نوع نرعقیمی موجب تسهیل در انجام تلاقی‌های لازم در برنامه‌های اصلاحی همچون تلاقی برگشتی می‌شود. هم‌چنین نرعقیمی ژنتیکی امکان کاربرد انتخاب دوره‌ای در جمعیت‌های تک‌جوانه‌ای را فراهم می‌کند و سبب افزایش تنوع ژنتیکی آنها می‌گردد. بوسمارک در سال ۱۹۷۰ یک روش انتخاب دوره‌ای را در چغندر قند با استفاده از ژن نرعقیمی ژنتیکی معرفی نمود(۵).

یک نشانگر مولکولی برای یک ژن خاص قسمتی از DNA است که کاملاً با ژن مورد نظر پیوسته باشد. بنابراین هر گیاه که حاوی یک نشانگر خاص باشد، حاوی ژن پیوسته به آن نیز خواهد بود (۹). چنانچه پیوستگی قوی بین نشانگر و مکان ژنی کنترل کننده صفت وجود داشته باشد اصلاح‌گران می‌توانند از نشانگرهای مولکولی جهت انتخاب غیرمستقیم افراد در جمعیت‌های در حال تفرق استفاده کنند (۸ و ۳۰).

نشانگر RAPD (Random amplified polymorphic DNA) یکی از نشانگرهای مولکولی است که با توجه به سادگی و سهولت، استفاده از آن در بسیاری از آزمایشگاه‌ها عمومیت پیدا کرده است (۲۰). نشانگرهای RAPD برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل کننده صفات مهم زراعی، مقاومت به بیماری‌ها (۱۳، ۲۱، ۲۴، ۲۵ و۲۹) و نر باروری (۱۷) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. چنین نشانگرهای پیوسته‌ای می‌توانند برای انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی (۱۴) و نیز برای غربال کردن کتابخانه‌های ژنومی جهت کلون کردن بر پایه نقشه به کار گرفته شود (۲۶و۳۳). استفاده از نشانگرهای RFLP برای انتخاب به کمک نشانگر پرهزینه و وقت‌گیر می‌باشد (۴، ۱۷، ۲۰ و ۳۵). نشانگرهای AFLP نیز پرزحمت بوده (۲۸ و ۳۶) و هزینه بالایی دارند. تاکنون مطالعاتی محدود و تنها با استفاده از چند جفت آغازگر و نشانگر SSR در چغندر قند انجام گرفته است. درتنها نقشه SSR ارائه شده برای چغندرقند، توالی آغازگرها در دسترس نمی‌باشند(۳۰). برای استفاده از نشانگرهای SSR لازم است آرشیوهای DNA از ژنوم چغندرقند تهیه نموده و کلون‌های حاصل را تعیین توالی نمود. سپس آغازگرهای مناسب براساس توالی‌های مجاور SSR قابل طراحی می‌گردند(۳۰).

مزیت بزرگ روش RAPD عدم نیاز به وجود اطلاعات در مورد ژنوم برای طراحی آغازگرها می‌باشد (۱۶و ۳۶). علاوه بر این نشانگرهای RAPD سریع و ارزان بوده و تهیه آنها آسان می‌باشد (۱۰و۱۵). با وجود این برای استفاده از نشانگرهای RAPD، در برنامه‌های اصلاحی به کمک نشانگر، بهتر است این نشانگرها را به نشانگرهای تکرارپذیر SCAR تبدیل نمود (۴و۲۴).

هدف از پژوهش حاضر، شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته به ژن نرعقیمی ژنتیکی در چغندرقند بوده است. در این پژوهش برای شناسایی ژن نرعقیمی ژنتیکی از نشانگر RAPD با روش تجزیه توده در حال تفرق (Bulked segregant analysis:BSA) استفاده گردید(۲۲).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از جمعیت‌های اتایپ (O-type) ۲۳۱ و ۲۶۱

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج استفاده شد که برای صفت نرعقیمی ژنتیکی در حال تفرق و معادل جمعیت F_2 می‌باشند. پس از ظهور گل‌ها، حداقل ۳۰ بوته نرعقیم و ۶۰ بوته نر بارور از داخل هر جمعیت شناسایی گردیده و از آنها نمونه برگی تهیه شد.

استخراج DNA

استخراج DNA به روش پیشنهادی تنکسلی و همکاران با اصلاحات واندربیک و همکاران انجام گرفت(۳۴ و ۳۷). غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Spectrolab - M350) در طول موج ۲۶۰ نانومتر و کیفیت آن نیز با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد تعیین گردید.

تجزیه RAPD

واکنش RAPD در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده شامل ۱۸۲ آغازگر از کیت AB (Advanced Biotechnology)، ۱۰۰ آغازگر از کیت UBC (University of British Colombia) و ۲۰ آغازگر از کیت اپرون ((Operon kit(OP) بودند. مخلوط واکنش حاوی: ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲میلی‌مولار dNTPs (از نماینده شرکت Fermentas در ایران، شرکت سیناژن)، بافر واکنش ۱x، ۱ واحد آنزیم پلیمراز تک (*Taq* Polymerase) (شرکت سیناژن)، ۲۵ نانوگرم آغازگر و ۵۰ نانوگرم DNAی الگو بود. واکنش در ترموسایکلر بیومترا (Biometra T3 thermocycler) و طبق برنامه زیر انجام گرفت: ۱) ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲) ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳) ۴۵ ثانیه در ۳۴/۵ درجه سانتی گراد، ۴) ۸۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۵) ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد که مراحل ۲تا ۴، ۳۹ بار تکرار گردید. فراورده‌های واکنش به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TAE شامل Tris- acetate ۰/۰۴ مولار، Na_2 EDTA ۰/۰۰۱ مولار، جداسازی گردید. پس از الکتروفورز، ژل در محلول حاوی ۱ µg/ml اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و به کمک دستگاه ترانس‌ایلومیناتور مشاهده و عکس‌برداری گردید.

تجزیه توده در حال تفرق (BSA)

مقادیر مساوی DNA از ۸ بوته نرعقیم و ۸ بوته نربارور در هر جمعیت با یکدیگر مخلوط و ۴ توده تشکیل گردید (۲ توده نرعقیم و ۲ توده نربارور). سپس با استفاده از ۳۰۲ نشانگر RAPD چندشکلی بین توده‌های فوق در مورد هر دو جمعیت ۲۳۱ و ۲۶۱ مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد آغازگرهای چند شکل ابتدا برای غربال بوته‌های تشکیل دهنده توده‌ها به کار رفت و آغازگرهایی که چند شکلی آنها در این مرحله تأیید شد روی سایر بوته‌های دو جمعیت آزمون شدند (۲۲). توالی نوکلئوتیدی آغازگرهایی که برای تکثیر نشانگرهای با فاصله کمتر از ۵۰ سانتی مورگان از ژن نرعقیمی ژنتیکی بوده است، در جدول ۱ آمده است.

تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون کای اسکور (Square $\chi 2$) تصحیح شده یتز (Yates) برای مقایسه نسبت مورد انتظار و مشاهده شده نشانگرها استفاده شد، زیرا درجه آزادی این آزمون برابر یک بود (۳۱). فاصله نشانگرهای RAPD و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی با استفاده از فراوانی بوته‌های نوترکیب تعیین گردید (۳ ، ۴ و۲۷).

نتایج و بحث

برای شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته با مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی، DNAی ۸ گیاه نربارور و ۸ گیاه نرعقیم در دو جمعیت ۲۳۱ و ۲۶۱ با نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط گردیده و هر کدام یک توده یا خزانه را تشکیل داد. چاگو و همکاران (۶) معتقدند که مخلوط کردن تعداد زیادی از افراد برای ساخت توده، باعث کاهش احتمال مشاهده تفاوت بین دو توده برای نواحی غیر از نواحی مجاور ژن هدف می‌گردد. از طرف دیگر،

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی آغازگرهایی که برای تکثیر نشانگرهایی که فاصله آنها با ژن نرعقیمی ژنتیکی کمتر از ۵۰ سانتی مورگان بوده است.

توالی نوکلئوتیدی	آغازگر
TGGCCGACTC	AB ۱-۹
CCTACACGCA	AB ۱-۱۲
CCGTTCACGG	AB ۳-۴
ACGGGAGTTC	AB ۳-۱۷
TCCGTCGCAA	AB ۴-۹
TCACTGCGCC	AB ۴-۱۰
GGCACCGACA	AB ۶-۵
AAGCGTCACC	AB ۶-۶
GGTGCATCTG	AB ۶-۱۴
TGTGGTGCGT	AB ۹-۱۸
TCGGCGAACC	AB ۸-۱۸
CCCGGCATAA	AB ۳-۱
CACCCGGATG	AB ۳-۱۴
TTATCGCCCC	AB ۲-۱۲
AGTCGCCCTT	AB ۶-۱۵
CTATCCTGCC	AB ۸-۴
GCGTGACCCG	UBC ۲۴۵
GTCCCGTGGT	AB ۳-۱۲
GTCTACGGCA	OPR-۶
AACCCTGACC	AB۲

میشل‌مور و همکاران (۲۲) و هم‌چنین گیووانونی و همکاران (۱۱) پیشنهاد کردند که افزایش اندازه توده می‌تواند سبب کاهش خطای نوع اول گردد.

در مرحله بعد هر توده با استفاده از ۳۰۲ آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی RAPD و بر اساس روش BSA (۲۲) مقایسه گردید. حدود ۲۰ درصد از آغازگرها (۶۰ آغازگر) توده‌های DNA را تکثیر نکردند، بقیه آغازگرها (۲۴۲ آغازگر) حدود ۱۹۰۰ نوار در هر جمعیت تولید کردند. عدم تکثیر تعدادی از نشانگرها می‌تواند به‌دلیل داشتن فقط یک محل اتصال یا زیاد بودن فاصله محل‌های اتصال متوالی روی ژنوم چغندر قند باشد.

تعداد ۵۳ و ۶۲ آغازگر حداقل دارای یک نوار چند شکل به ترتیب دربین توده‌های متقابل جمعیت‌های ۲۳۱ و ۲۶۱ بودند. وجود تعداد نشانگرهای چند شکل بیشتر در جمعیت ۲۶۱ ممکن است ناشی از زیادتر بودن تنوع این ژرم‌پلاسم باشد.

برای تعیین تکرارپذیری نشانگرهای چند شکل شناسایی شده، آغازگرهای مربوطه مجدداً روی توده‌های متقابل دو جمعیت آزمون شد. در پایان این مرحله ۲۸ آغازگر که اکثراً در هر دو جمعیت چند شکلی نشان داده بودند، مشخص گردیدند. از این تعداد، یک آغازگر دارای ۴ نوار چند شکل، ۲ آغازگردارای ۳ نوار چند شکل، ۷ آغازگر دارای ۲ نوار چند

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

شکل و بقیه آغازگرها هر کدام دارای یک نوار چند شکل بودند. در مجموع ۴۲ نوار چند شکل تولید شد که ۲۲ عدد از آنها در توده نرعقیم (نشانگر ناجفت (Repulsion)) و ۲۰ عدد باقی‌مانده در توده نربارور (نشانگر جفت (Coupling)) وجود داشتند.

در نهایت، آغازگرهای چند شکل شناسایی شده بر روی DNAی تک بوته‌های تشکیل دهنده توده‌های متقابل (۸ بوته نربارور و ۸ بوته نرعقیم از هر جمعیت)و سایر بوته‌های نرعقیم و نربارور جمعیت‌ها آزمون گردید (در حداکثر ۵۴ بوته نرعقیم و ۷۴ بوته نربارور دیگر). برای نام‌گذاری نشانگرها بعد از علامت اختصاری سازنده آغازگر و شماره آغازگر در مجموعه مورد استفاده، اندازه نوار ایجاد شده به همراه علامت اختصاری r یا c (به ترتیب به معنای نشانگر ناجفت و جفت) ذکر گردید.

پس از به دست آمدن اطلاعات مربوط به نشانگرها، ابتدا نحوه تفرق آنها با استفاده از آزمون کای اسکور تصحیح شده در هر دو جمعیت بررسی گردید. از آنجایی که انتخاب بوته‌های مورد مطالعه به صورت تصادفی نبوده است، انتظار می‌رفت، آزمون کای‌اسکور برای بررسی نحوه تفرق نشانگرها در بسیاری از موارد معنی‌دار شود. با وجود این، آزمون کای‌اسکور تصحیح شده برای فرض ۳:۱ در مورد نشانگرها انجام گرفت که نتایج حاصله موضوع فوق را تأئید کرد. برای مثال در جمعیت ۲۳۱ حدود ۴۵ درصد از نشانگرها از نسبت مورد انتظار مندلی انحراف نشان دادند. بنابراین نتیجه‌گیری شد که حداقل درصدی از انحراف تفرق (Segregation distortion) مشاهده شده برای نشانگرهای مورد بررسی ناشی از تصادفی نبودن بوته‌های انتخابی بوده است. البته بخشی از این موضوع نیز ممکن است مربوط به ماهیت ژنوم چغندرقند باشد. برای مثال، یوفف و ریکی (۳۵) و امیری (۱) میزان انحراف تفرق نشانگرهای RAPD را در جمعیت F_2 به ترتیب در حدود ۲۳ و ۲۱ درصد گزارش نموده و این امر را ناشی از ماهیت ژنوم چغندرقند دانسته‌اند. این موضوع احتمالاً به دلیل حذف انتخابی گامت‌های نر در نتیجه عقیمی دانه گرده یا خودناسازگاری (۱، ۳۲ و ۳۹)، حذف انتخابی گامت‌های ماده (۳۲) و یا در اثر تفاوت‌های شایستگی بین زیگوت‌ها می‌باشد (۱و۳۹). با توجه به این که در ژنوم چغندرقند چندین ژن کشنده به خصوص بر روی کرموزوم‌های ۱، ۲ و ۵ یا گروه‌های پیوستگی ۱، ۵، ۶ و ۸ (۲۸) گزارش شده است و در ضمن مکان کرموزومی نشانگرهای RAPD نامشخص می‌باشد(۳۸)، پیوستگی نشانگرها و مکان‌های ژنی کشنده می‌تواند وجود انحراف تفرق را توجیه نماید (۱).

درصد نوترکیبی بین نشانگرها و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی در دو جمعیت ۲۳۱ و ۲۶۱چغندرقند محاسبه گردید (جدول ۲). تعداد بوته‌های نوترکیب برای نشانگرهای جفت برابر جمع تعداد بوته‌های نربارور فاقد نشانگر و بوته‌های نرعقیم واجد نشانگر و تعداد بوته‌های نوترکیب برای نشانگر ناجفت معادل دو برابر تعداد بوته‌های عقیم فاقد نشانگر بود. چون RAPD یک نشانگر غالب است (۱۰، ۱۵، ۲۳ و۳۶) و برای نشانگر ناجفت امکان تعیین تعداد بوته‌های نوترکیب در بین گیاهان بارور وجود نداردر مورد برخی از نشانگرها، حداقل در یک گروه از ژنوتیپ‌ها (نربارور یا نرعقیم) فراوانی بوته‌های نوترکیب (درصد نوترکیبی) بیشتر از ۵۰ درصد بود (جدول ۲). بنابراین فاصله نشانگرهای مذکور و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی حداقل ۵۰cM می‌باشد. در مرحله بعد با استفاده از فراوانی بوته‌های نوترکیب(۳، ۴ و۲۷)، فاصله تقریبی نشانگرهای RAPD و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی در مورد نشانگرهایی که در آنها در هر دو گروه از ژنوتیپ‌های نربارور و نرعقیم حداقل در یکی از دو جمعیت فراوانی نوترکیبی کمتر از ۵۰ درصد بود، محاسبه گردید. این محاسبه به تفکیک برای دو جمعیت ۲۳۱ و ۲۶۱ و در مجموع دو جمعیت انجام گردید (جدول ۳). از میان آغازگرها نشانگر AB ۸-۱۸-۶۰۰r نزدیک‌ترین نشانگر به مکان ژنی مورد نظر بود. فاصله این نشانگر و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی در جمعیت ۲۳۱، به طور تقریبی برابر ۶/۸ cM و در جمعیت ۲۶۱، به طور تقریبی برابر ۳/۱ cM محاسبه شد. در

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

جدول ۲. درصد نو ترکیبی (٪) بین نشانگرهای RAPD و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی در جمعیت ۲۳۱ و ۲۶۱چغندرقند

نشانگر	جمعیت ۲۳۱			جمعیت ۲۶۱		
	تعداد گیاهان آزمون شده	نرعقیم	نرباروور	تعداد گیاهان آزمون شده	نرعقیم	نرباروور
AB ۳–۱– ۸۰۰r	۲۱	۶۶	ــــ	۳۳	۵۲	ــــ
AB ۸–۱۸–۶۰۰r	۸۲	۸	ــــ	۶۲	۳	ــــ
AB ۳–۱۴–۸۰۰r	۲۸	۷۰	ــــ	۲۸	۵۳	ــــ
AB ۱–۹–۵۰۰c	۲۷	۵۷	۲۳	۲۴	۴۱	۱۶
AB ۲–۱۲–۹۵۰c	۲۰	۳۸	۵۷	۳۹	۳۱	۶۰
AB ۶–۱۵–۹۰۰r	۲۳	۵۰	ــــ	۳۰	۶۴	ــــ
AB ۶–۶–۹۰۰r	۵۰	۲۰	ــــ	۲۲	۷۰	ــــ
AB ۱–۱۲–۴۸۰r	۵۷	۳۴	ــــ	۳۴	۳۴	ــــ
AB ۸–۴–۸۵۰c	۳۶	۴	۱۰۰	۲۴	۳۱	۵۰
AB ۴–۹–۱۵۵۰r	۲۳	۲۵	ــــ	۲۵	۶۶	ــــ
AB ۶–۱۴–۸۵۰r	۳۱	۲۹	ــــ	۳۰	۳۵	ــــ
AB ۶–۱۴–۱۱۵۰r	۳۱	۷۰	ــــ	۳۰	۷۰	ــــ
AB ۳–۴–۱۱۰۰r	۶۸	۳۶	ــــ	۳۴	۲۳	ــــ
UBC ۲۴۵–۱۲۰۰r	۳۰	۵۰	ــــ	–	ــــ	ــــ
AB ۳–۱۷–۱۸۰۰c	۲۸	۴۶	۴۰	۲۹	۳۶	۵۶
AB۲–۸۵۰c*	۵۰	۸۰	۱۷	–	ــــ	ــــ
AB۲ –۱۶۰۰c*	۵۰	۴۰	۳۱	–	ــــ	ــــ
AB ۲ –۱۷۰۰c*	۵۰	۷۳	۲۲	–	ــــ	ــــ
AB ۴–۱۰–۷۵۰c	۲۵	۴۱	۴۶	۲۸	۳۸	۶۶
AB ۴–۱۰–۱۳۵۰c	۲۵	۲۵	۶۹	۲۸	۴۶	۷۳
AB ۹–۱۸–۱۱۰۰r	۳۱	۳۳	ــــ	۲۷	۵۰	ــــ
AB ۳–۱۲–۲۵۰۰c*	–	ــــ	ــــ	۲۷	۱۸	۶۲
AB ۶–۵–۱۱۵۰c*	–	ــــ	ــــ	۲۹	۳۳	۴۷
OPR- ۶–۱۱۰۰c*	۴۶	۲۳	۷۲	–	ــــ	ــــ

r : بیانگر نشانگر ناجفت و c : بیانگر نشانگر جفت است.

* : این نشانگرهای جفت ابتدا بر روی برخی از بوته‌های یکی از دو جمعیت آزمون شد. نظر به این که فراوانی نوترکیبی در مورد آنها زیاد بود، از بررسی این نشانگرها در جمعیت دیگر صرف‌نظر گردید.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

جدول ۳. فاصله تقریبی نشاگرهای RAPD (بر حسب سانتی مورگان) و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی در جمعیت‌های ۲۳۱ و ۲۶۱ چغندرقند

نشانگر	جمعیت			نشانگر	جمعیت		
	۲۳۱	۲۶۱	کل		۲۳۱	۲۶۱	کل
AB ۸-۱۸-۶۰۰r	۶/۸	۳/۱	۵/۳	AB ۳-۴-۱۱۰۰r	۲۸/۹	۱۸/۷	۲۴/۵
AB ۶-۵-۱۱۵۰c	ــــ	۴۱/۳	ــــ	AB ۴-۹-۱۵۵۰r	۱۴/۲۸	ــــ	ــــ
AB ۱-۹-۵۰۰c	ــــ	۲۹/۱	ــــ	AB ۳-۱۷-۱۸۰۰c	۴۲/۸	ــــ	ــــ
AB ۶-۱۴-۸۵۰r	۱۸/۹	۲۱/۸	۲۰/۱	AB۲ -۱۶۰۰c	۳۴	ــــ	ــــ
AB ۶-۶-۹۰۰r	۱۳/۳	ــــ	ــــ	AB ۴-۱۰-۷۵۰c	۴۴	ــــ	ــــ
AB ۱-۱۲-۴۸۰r	۲۸/۲	۲۸/۱	۲۸/۲	AB ۹-۱۸-۱۱۰۰r	۲۰/۷	-	-

r : بیانگر نشانگر ناجفت و c : بیانگر نشانگر جفت است. در مورد نشانگرهایی از جدول ۲ که فراوانی نوترکیبی در یکی از دو جمعیت برابر ۵۰ درصد یا بیشتر بود، فاصله نشانگر و مکان ژنی محاسبه نشده‌است.

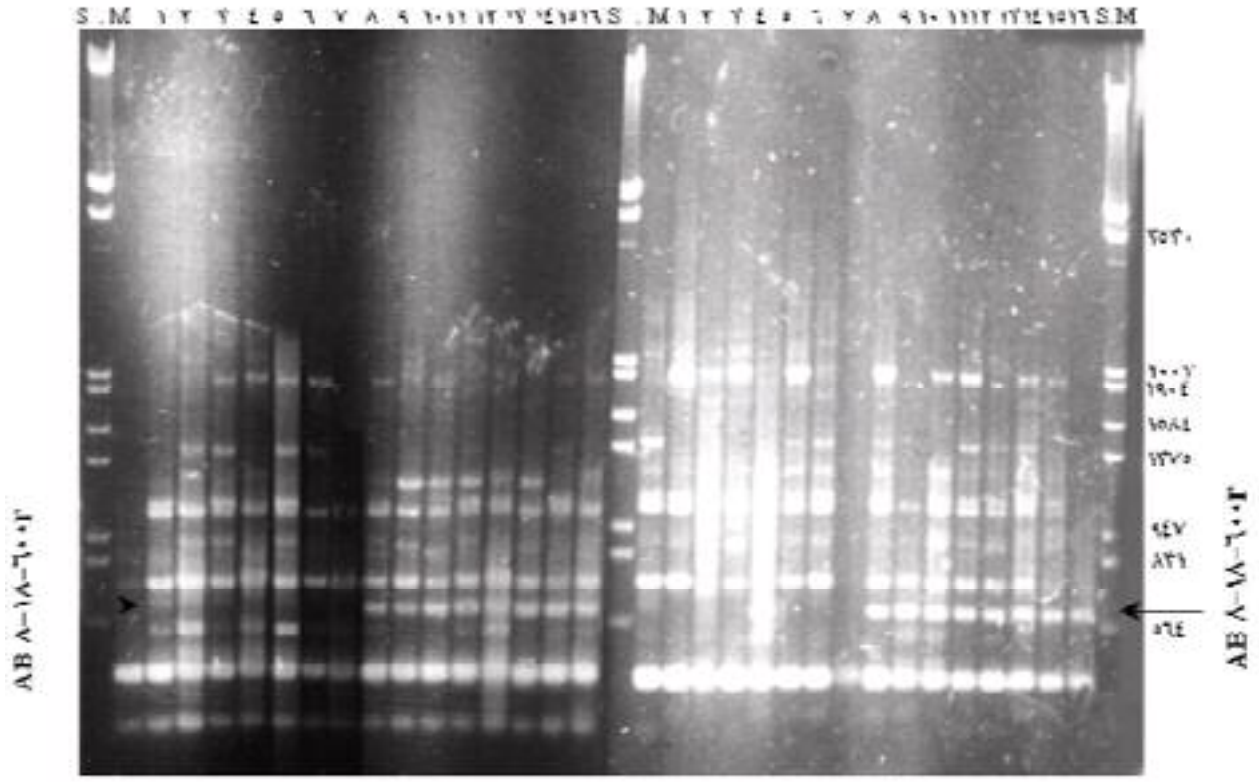
مجموع و با استفاده از داده‌های گیاهان هر دو جمعیت، فاصله این نشانگر از ژن نرعقیمی ژنتیکی در حدود ۵/۳ سانتی‌مورگان محاسبه گردید. در الگوی الکتروفورزی این نشانگر روی بوته‌های تشکیل دهنده توده‌های متقابل (۸ بوته نربارور و ۸ بوته نرعقیم)در دو جمعیت نوار موردنظر (۶۰۰bp) در کلیه بوته‌های نرعقیم هر دو جمعیت وجود داشت، در حالی که فقط یکی از بوته‌های نربارور از جمعیت ۲۶۱ نوار را نشان داد (شکل ۱). با توجه به ناجفت بودن این نشانگر، می‌توان اظهار داشت که ژنوتیپ بوته مورد نظر هتروزیگوت است.

بر اساس این یافته نشانگرهای نزدیک به مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی همگی از نوع ناجفت بودند (جدول ۳) که از بین آنها به جز نشانگر AB ۸-۱۸-۶۰۰r ، فاصله بقیه نشانگرها جهت استفاده در انتخاب به کمک نشانگر زیاد می‌باشد (۲۲و۲۷). با توجه به این که جمعیت مورد مطالعه F_2 و نشانگر مورد استفاده غالب بود، لذا نیازی به استفاده از نرم‌افزار (برای مثال Mapmaker) برای محاسبه فاصله نشانگرها و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی وجود نداشت، زیرا در شرایط فوق، تابع درستنمایی فاصله نشانگرهای ناجفت را با اریب برآورد می‌کند (محمدی، مکاتبات شخصی، ۱ و ۱۹). با این حال با استفاده از نرم‌افزار Mapmaker (۱۸) با LOD Score برابر ۳ و حداکثر فاصله ۴۰ سانتی مورگان نشانگرها و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی به گروه‌های پیوستگی نسبت داده شدند که در نتیجه فاصله نشانگر AB ۸-۱۸-۶۰۰r و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی در جمعیت‌های ۲۳۱ و ۲۶۱ و مجموع دو جمعیت به ترتیب برابر ۳۶/۰ ، ۱۵/۴ و ۳۰/۵ سانتی مورگان برآورد شد. این نتیجه با نتایج مطالعه قبلی (۱) مبنی بر وجود اریب زیاد در براوردهای نرم‌افزار Mapmaker برای نشانگرهای ناجفت کاملا مطابقت داشت.

با توجه به این که پیوستگی نشانگر AB ۸-۱۸-۶۰۰r و مکان ژنی نرعقیمی ژنتیکی بالا بوده (r = ۵/۳ cM) و در عین حال یک نشانگر ناجفت می‌باشد، در یک جمعیت در حال تفرق (دارای ژنوتیپ‌های aa. Aa, AA برای نرعقیمی) می‌تواند ژنوتیپ AA (هموزیگوت بارور) را از ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت مغلوب شناسایی نماید. شناسایی هر سه ژنوتیپ

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]



شکل ۱. الگوی نواری نشانگر AB ۸-۱۸۶۰۰r در جمعیت‌های ۲۳۱ (چپ) و ۲۶۱ (راست) چغندرقند. خطوط ۱ تا ۸ در هر سمت مربوط به گیاهان نر بارور و خطوط ۹ تا ۱۶ مربوط به گیاهان نرعقیم می‌باشد. SM، استاندارد جرم مولکولی با اندازه قطعات مشخص شده برحسب جفت باز است.

با استفاده توأم از نشانگرهای فاز ناجفت و جفت امکان‌پذیر است و کارایی بیشتری در برنامه‌های اصلاحی به عنوان نشانگرهای همبارز خواهد داشت. بنابراین پیشنهاد می‌گردد با استفاده از سایر آغازگرهای تصادفی، نشانگر با فاز جفت نیز برای صفت نرعقیمی ژنتیکی شناسایی شود.

توصیه می‌شود نشانگر AB ۸-۱۸-۶۰۰r روی جمعیت‌های دیگر هم آزمون گردد تا میزان تکرارپذیری آن بیشتر مشخص شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود برای افزایش قابلیت تکرارپذیری نشانگر AB ۸-۱۸-۶۰۰r، ایجاد اطمینان بیشتر در استفاده از این نشانگر و برای اختصاصی نمودن واکنش PCR، نوار مربوطه جداسازی شده و پس از تعیین توالی به نشانگر SCAR تبدیل شود.

منابع مورد استفاده

۱. امیری، ر. ۱۳۸۲. وراثت ژن(های) عامل مقاومت به ریزومانیا و شناسایی نشانگرهای DNAی پیوسته با آنها در چغندرقند. پایان‌نامه دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲. فارسی، م. و ع. باقری. ۱۳۷۷. *اصول اصلاح نباتات*. انتشارات دانشگاه مشهد.

3. Barzen, E., W. Mechelke, E. Ritter, J.F. Seitzer and F. Salamini. 1992. RFLP markers for sugar beet breeding: Chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogermy and hypocotyl colour. The Plant J. 2: 601-611.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

4. Barzen, E., R. Stahl, E. Fuchs, D. Borchardt and F. Salamini.1997. Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet *Rr1* allele conferring resistance to rhizomania. Mol. Breed. 3: 231-238.
5. Bosemark, N.O. 1970. Use of Mendelian male sterility in recurrent selection and hybrid breeding in beets. Report of meeting held at the station d. Amelioration des Plantes ourrageres. PP. 127-134.
6. Chague, V., J. C.Mercier, M. Guenard, A. deCourcel and F. Vedel. 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. Theor. Appl. Genet. 92: 1045- 1051.
7. Darbshwar, R. 2000. Plant Breeding. Analysis and Exploitation of Variation. Alpha Science International Ltd., India.
8. Francis, S. 1999. Using molecular markers to understand rhizomania and powdery mildew resistance. Br. Sugar Beet Rev. 67 :16-19.
9. Francis, S.A., M. Redfearn, D.M. Chwarszczynska, M.J. Asher and R. T. Lewellen. 1998. Use of molecular markers in breeding for disease resistance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Aspects of Appl. Biol. 52: 279- 285.
10. Giovannoni, J.J., R.A. Wing, M.W. Ganal and S.D. Tanksley. 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. Nucleic Acids Res. 19: 6553-6558.
11. Haley, S.D., P.N. Miklas, J.R. Stavely, J. Byrum and J.D. Kelly. 1993. Identification of RAPD markers linked to major rust resistance gene block in common bean. Theor. Appl. Genet. 86: 505-512.
12. Hansen M., C. Hallden, N.O. Nilsson and T. Sall. 1997. Marker assisted selection of restored male-fertile *Brassica napus* plants using a set of dominant RAPD markers. Mol. Breed. 3: 449-456.
13. Hansen, M., C. Hallden and T. Sall. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. Plant Molecular Biol. Rep. 16: 139- 146.
14. Henson, J.M. and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol 31: 81-109.
15. Jean, M., G.G. Brown and B.S. Landry. 1997. Genetic mapping of nuclear fertility restorer genes for the polima cytoplasmic male sterility in canola (*Brassica napus* L.) using DNA markers. Theor. Appl. Genet. 95: 321-328.
16. Lander, E.S., P. Green, I. Abrahamson, A.Barlow, M.J. Daley, S.E.Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. Genomics, 1: 174-181.
17. Liu, B.H. 1998. Statistical Genomics: Mapping and QTL Analysis. CRC Press, New York.
18. Laucou, V., K. Haurogn, N. Ellis and C. Rameau. 1998. Genetic mapping in pea, 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. Theor. Appl. Genet. 97: 905-915.
19. Martin G.B., J.G.K. Williams and S.D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 2336-2340.
20. Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 9828- 9832.
21. Novy, R.G. and N. Vorsa. 1996. Evidence for RAPD heteroduplex formation in ranberry: implications for pedigree and genetic-relatedness studies and a source of co-dominant RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 92: 840-849.
22. Ohmori, T., M. Murata and F. Motoyoshi. 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. Theor. Appl. Genet. 92: 151-156.
23. Paran I., R. Kesseli and R.W. Michelmore. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. Genome 34: 1021-1027.
24. Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR- based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85: 985- 993.
25. Paterson, A.H.; S.D. Tanksley and M.E. Sorrells. 1991. DNA markers in plant improvement. Adv. Agron. 46: 39-90.
26. Pillen, K., G. Steinrucken, R. Herrmann and C. Jung. 1993. An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and the restorer gene. Plant Breed. 111: 265-272.
27. Poulsen, D.M.E, R.J. Henry, R.P. Johnston, J.A.G. Irwin and R.G. Rees. 1995. The use of bulked segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barely. Theor. Appl. Genet. 91: 270- 273.
28. Pradeep, M., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2002. Inter simple Sequence repeat (ISSR) polymorphism & its application in plant breeding. Euphytica 128: 9-17.
29. Rae, S.J., K.J. Edwards and S.R. Barnes. 1998. Development and testing of informative DNA microsatellite markers in sugar beet. Proceeding of the 61st IIRB Congress, Brussels, PP.403-410.
30. Rae, S.J., C. Aldam, I. Duminguez, M. Hoebrechts, S.R. Barnes and K.J. Edwards. 2000. Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* spp.). Theor. Appl. Genet. 100: 1240-1248.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]

31. Seefelder, S., H. Ehrmaier, G. Schweizer and E. Seigner. 2000. Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. Plant Breed. 119: 249-255.
32. Steel, R.G.D. and H. Torrie.1980. Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach. McGraw-Hill, New York.
33. Subudhi, P.K. and N. Huang. 2002. Identification of genes responsible for segregation distortion in a doubled haploid population of rice by using molecular markers. Rice Genetics Newsletter 12: 239-240.
34. Tanksley S.D., M.W. Ganal and G.B. Martin. 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based cloning in plants with large genomes. Trends Genet. 11: 36-68.
35. Uphoff, H. and G. Wricke. 1995. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris*) based on RAPD markers. Plant Breed. 114: 355- 357.
36. VandenBroecke, A., J.D. Reik, I. Roldan-Rluiz. A. Wauters, E. Van Bockstaele and M. De Loose. 1998. DNA markers: a tool for plant variety description, recognition and stability testing. Proceeding of the 61st IIRB Congress, Brussels, PP. 151-165.
37. VanderBeek, J.G., R. Verkerk, P. Zabel and P. Lindhout. 1992. Mapping strategy for resistance genes in tomato based on RFLPs between cultivars: *Cf9* (resistance to *Cladosprium fulvum*) on chromosome 1. Theor. Appl. Genet. 84: 106- 112.
38. Virk. P.S., H.J. Newbury, M.T. Jackson and B.V. Ford-Lioyd. 2000. Are mapped markers more useful for assessing genetic diversity. Theor. Appl. Genet. 100: 607-613.
39. Wagner H., W.E. Weber and G. Wricke. 1992. Estimating linkage relationship of isozyme markers and morphological markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including families with distored segregations. Plant Breed. 108: 89-96.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.29.6]