

شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندر قند با استفاده از تجزیه تفرق توده‌ای

سیدمحمدامین فقهی^{۱*}، پیمان نوروزی^۲، عباس سعیدی^۳، کاوه زرگری^۴

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. استادیار اصلاح نباتات، موسسه اصلاح بذر چغندر قند، کرج، ایران
۳. دانشیار ژنتیک مولکولی گیاهی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استادیار اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین - پیشوا، ورامین، ایران

مکان انجام تحقیق: کرج، روبروی ترمینال شهید کلانتری، آزمایشگاه مارکرهای مولکولی، موسسه اصلاح بذر چغندر قند

مسئول مکاتبات: سید محمد امین فقهی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، پست الکترونیکی: smafegghi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۶/۲۰

چکیده

ریزومانیا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندر قند در ایران و برخی از نقاط جهان است که نقش مهمی در کاهش محصول ریشه و محتوای قند دارد. یکی از روش‌های مبارزه با این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. از نشانگرهای مولکولی برای نشان‌دار کردن ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی استفاده می‌شود. برای شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در منبع HOLLY محققین مؤسسه بذر چغندر قند اقدام به ایجاد یک جمعیت F₂ نمودند. در این تحقیق با استفاده از ۲۱۵ ترکیب جفت آغازگرهای RAPD و همچنین به‌کارگیری روش تجزیه تفرق توده‌ای اقدام به شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در دو توده مقاوم و حساس به این بیماری و همچنین بوته‌های جمعیت F₂ گردید. سه ترکیب جفت آغازگر در DNA دو توده مقاوم و حساس تولید چندشکلی نمودند. این جفت آغازگرها بعد از آزمون روی تک بوته‌های دو توده، سپس روی تک بوته‌های جمعیت F₂ مورد آزمون و تجزیه قرار گرفتند. در نهایت، فاصله نشانگرها از ژن مقاومت توسط دو روش استفاده از نرم‌افزار Mapmaker ver. 3.0 و روش استفاده از فراوانی بوته‌های نوترکیب، تعیین گردید. نشانگر R2 با فاصله ۸/۳ سانتی‌مورگان در موقعیت ناجفت و دو نشانگر C2 و C5 به ترتیب با فاصله ۳۲/۸۷ و ۴۳/۷ سانتی‌مورگان از ژن مقاومت قرار داشتند. داده‌های ارائه شده برای امکان استفاده از این نشانگرها در برنامه اصلاح چغندر قند برای مقاومت به ریزومانیا مورد بحث قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: ریزومانیا، نشانگر RAPD، جفت آغازگر، چغندر قند، ژن *Rz1*.

مقدمه

می‌کند، ریزومانیا است. اولین بار گزارش‌هایی از رشد ضعیف چغندر قند بر اثر عامل ایجادکننده این بیماری از شمال ایتالیا منتشر گردید (۲). آزمایشی در فرانسه برای ارزیابی میزان خسارت بیماری ریزومانیا صورت گرفت و از سموم تدخینی از قبیل متیل بروماید یا دی کلروپروپن برای ریشه‌کنی ویروس و ناقل آن در لایه‌های سطحی خاک استفاده گردید و با ضد عفونی خاک با چنین سمومی،

چغندر قند (*Beta vulgaris L.*) یکی از دو محصول مهم تأمین‌کننده قند در جهان است. در سال ۲۰۰۷ نیشکر و چغندر قند به ترتیب ۷۵ و ۲۵ درصد قند جهان را تولید نموده‌اند (۱). اصلاح‌گران نیز تاکنون تلاش بسیاری برای ایجاد مقاومت به بیماری‌ها در چغندر قند کرده‌اند. با این حال، مهم‌ترین بیماری که این گیاه و زراعت آن را تهدید

پلی میکسا بتا کسکین (*Polymyxa betae*) Keskin) منتقل می‌شود (۱۳). اقتصادی‌ترین راه مبارزه با این بیماری تولید ارقام مقاوم است. می‌توان بجای استفاده از انتخاب فنوتیپی در روش‌های اصلاحی، گیاهان موردنظر را توسط نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوتیپی تفکیک نمود. استفاده از نشانگرهای مولکولی، روشی سریع‌تر و مطمئن‌تر است. از این رو، نشانگرهای مولکولی می‌توانند به عنوان ابزار مؤثری در انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به ریزومانیا مورد استفاده قرار گیرند. هدف از این تحقیق، شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندر قند بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

از تلاقی رقم مقاوم *B. vulgaris* subsp. *Vulgaris* Holly-1-4 با یک رقم چغندر قند یکساله حساس در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند کرج یک جمعیت F₂ تهیه و با استفاده از آزمون الایزا به دو گروه گیاهان مقاوم و حساس تقسیم گردید (۱۴).

استخراج DNA

DNA ژنومی، از برگ‌های یخ زده گیاهان جمعیت F₂ و والدین آن‌ها با استفاده از روشی که توسط Murry و Thompson (۱۹۸۰) (۱۵) شرح داده شده، با کمی تغییرات استخراج گردید. DNA به وسیله کلروفرم و ایزوآمیل الکل جدا و در ۷۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و توسط ایزوپروپانول سرد، رسوب داده شد (۱۶). سپس DNAها برای یک ساعت به ۲۰°C- منتقل و مجدداً در ۹۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. رسوب‌های DNA در ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر بافر TE (Tris 10mM+EDTA 1mM) حل شدند. RNA توسط ۲۰-۱۰ μg/ml RNase (Roche) تجزیه گردید. کیفیت و کمیت DNAها توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد با غلظت مشخصی از آنزیم غیر برشی لامبدا (Roche) DNA مورد ارزیابی قرار گرفت و تصویر ژل با استفاده از دستگاه UV.DOC

محصول شکر در فرانسه از ۲/۱ به ۶/۹ تن در هکتار (۳) و در آزمایش مشابهی در کالیفرنیا، از ۱/۳ تن به ۷/۹ تن در هکتار افزایش یافت (۴). در این حالت اندازه غده به شدت کاهش می‌یابد، ریشه‌های آلوده قادر به جذب آب و مواد معدنی نیستند و در نتیجه برگ‌ها به طور عمومی به رنگ زرد کم‌رنگ درآمده و رگبرگ‌های آنان دچار رشد بلند و عمودی می‌شود. ویروس عامل این بیماری به نام ویروس رگبرگ‌های زرد سوختگی چغندر قند (*BNYVV, Beet necrotic yellow vine virus*) می‌باشد که به‌طور سیستمیک در برگ‌ها پخش و سبب زردی رگبرگ‌ها می‌گردد. علائم ظاهری آن روی ریشه‌ها بدین صورت است که اگر آلودگی در مراحل پایانی رشد گیاه صورت گیرد، ممکن است هیچ نشانه‌ای ظاهر نگردد و اگر آلودگی زودتر اتفاق افتد توده‌ای از ریشه‌های جانبی ظریف، مویی، نکروتیک و غیرزنده به وجود می‌آید که ریشه را از حالت غده‌ای به حالت ریشه ریشی در می‌آورد. بافت‌های آوندی در ریشه‌های آلوده اغلب به رنگ تیره درمی‌آید، اندازه غده نیز ممکن است به شدت کاهش یافته، غده حالت منقبض به خود می‌گیرد و فاسد می‌شود (۵)، (۶). ممکن است محتوای قند در چغندرهای آلوده به طور چشمگیری از ۱۷ درصد به ۱۰ درصد و محصول ریشه نیز تا ۹۰ درصد کاهش یابد. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ از شمال ایتالیا گزارش گردید (۲). گسترش منطق آلوده به این بیماری در ژاپن در سال ۱۹۶۵ (۷) منجر به جداسازی، تشخیص، توصیف و نام‌گذاری ناقل این بیماری، یعنی ویروس سوختگی رگبرگ‌های زرد چغندر قند (*BNYVV*) شد (۵). تاکنون چندین ژن مقاومت به ریزومانیا در چغندر قند شناسایی گردیده که از منابع مختلفی منشأ می‌گیرند. مهم‌ترین منابع مقاومت به ریزومانیا در ژرم‌پلاسماهای *Beta vulgaris* Holly (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* WB42 و *Beta vulgaris* subsp. *maritima*) وجود دارد (۸، ۹). مقاومت موجود در اکثر ارقام چغندر قند از منبع *Beta vulgaris* Holly منشأ می‌گیرد (۱۰). مقاومت به ریزومانیا توسط یک ژن غالب به نام *RzI* ایجاد می‌شود (۱۱، ۱۲). ویروس این بیماری توسط قارچ خاکزادی به نام

دو مخلوط DNA ایجاد چندشکلی نمودند مجدداً به صورت تکی و ترکیب جفتی روی مخلوطها آزمایش شدند تا مطمئن شویم چندشکلی ایجاد شده، در نتیجه ترکیب دو آغازگر است و حاصل تک آغازگر نیست. پس از تایید ایجاد چندشکلی بر اثر ترکیب جفت آغازگر، این ترکیب روی دو مخلوط DNA و تک بوته‌های تشکیل‌دهنده آنها آزمایش شد تا فاصله نشانگر از ژن مشخص شود. در آخر، آن دسته از ترکیبات آغازگرها که فاصله‌ای کمتر از ۳۰ سانتی مورگان از ژن *RzI* نشان دادند روی تک‌بوته‌های جمعیت، مورد آزمایش قرار گرفتند.

تعیین نقشه نشانگرهای RAPD

نشانگرهای RAPD توسط تجزیه خانوادگی تفرق‌یافته با دو روش استفاده از نرم‌افزار Mapmaker ver 3.0 و روش استفاده از فراوانی بوته‌های نوترکیب (۱۸، ۱۹) تعیین نقشه گردیدند. برای هر یک از نشانگرها حداقل ۱۴ بوته در دو سطح مقاوم و حساس مورد تجزیه قرار گرفت.

$$\chi^2 = \sum \frac{(|\text{observed} - \text{expected}| - 0.5)^2}{\text{expected}}$$

در این تجزیه فرض شد که هر هفت تا از مقاوم‌ترین بوته‌ها با حداکثر لگاریتم ۰/۳ ng/ml غلظت ویروس حاوی ژن بزرگ اثر مقاومت باشند، در حالی که هر هفت تا از حساس‌ترین بوته‌ها با حداقل لگاریتم ۰/۶ ng/ml غلظت ویروس فاقد این ژن باشند، اگر مقدار LOD (logarithm of odds) Yates بیشتر از ۳/۰ شود، لینکاژ معنی‌دار می‌شود. Yates مربع اسکور را پیشنهاد کرد. از آزمون کای اسکور تصحیح شده Yates با درجه آزادی یک برای مقایسه نسبت‌های مورد انتظار و مشاهده شده استفاده گردید (۲۰).

همچنین، برای محاسبه فاصله نشانگرها از مکان ژنی *RzI* از فرمول Barzen و همکاران (۱۹۹۲) (۱۸) در حالت جفت و Amiri و همکاران (۲۰۰۹) (۱۹) در حالت ناجفت نیز استفاده گردید. همان‌طور که در زیر مشاهده می‌شود در فرمول

و نرم‌افزار ACDSer.Pro.2.0.219, Final مشاهده گردید. غلظت DNA توسط طیف‌سنجی نوری تعیین شد.

پروتکل RAPD

برای ایجاد بهترین شرایط PCR، غلظت‌های مناسب نمک، آغازگر و DNA توسط آزمون گرادیان غلظت تعیین گردید. PCR در تیوب‌های حاوی ۱۱ μl ۲۵ محلول واکنش شامل ۵۰ ng DNA ژنومی، ۰/۲ mM از هر یک از نوکلئوتیدهای dATP، dGTP، dCTP و dTTP، ۵۰ ng از هر آغازگر (کیت‌های advance biotech و Operon)، ۲/۵ از ۱۰x بافر واکنش (Tris-Hcl 100 mM با ۹ pH، ۵۰۰ mM KCl) و ۱ واحد آنزیم SmarTaq DNA پلیمرز تهیه شد. تکثیر DNA درون ویال‌های واکنش PCR در داخل دستگاه چرخش دمایی بیومترا T₃ انجام شد. چرخه‌های دمایی انجام شده شامل یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در ۹۴°C، ۴۰ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴°C، و در آخر ۸۰ ثانیه در ۷۲°C و در آخر ۱۰ دقیقه در ۷۲°C برای افزایش طول نهایی بودند. محصولات تولید شده توسط ژل آگارز با غلظت ۱/۴ درصد درون بافر TAE تفکیک و توسط اتیدیوم بروماید با غلظت ۱ μg/ml رنگ‌آمیزی شدند.

تجزیه تفرق توده‌ای (Bulk segregant analysis, BSA)

برای شناسایی نشانگرهایی که همراه با ژن مقاومت به ریزومانیا تفکیک می‌شوند، از آزمون تجزیه تفرق توده‌ای که توسط Michelmore و همکاران (۱۹۹۱) (۱۷) توضیح داده شده، با کمی تغییرات استفاده گردید. نمونه DNA رقیق‌شده هفت عدد از مقاوم‌ترین و هفت عدد از حساس‌ترین گیاهان جمعیت F₂-A₁-110 بطور جداگانه با یکدیگر مخلوط و توسط ۲۱۵ ترکیب جفت آغازگرهای RAPD غربال شدند. میانگین الیازی بوته‌های مقاوم و حساس، به ترتیب ۰/۱۳۷ و ۱/۲۵۸ بود. آن دسته از ترکیبات جفت آغازگرها که در بین

نشانگر در گیاهان مقاوم ممکن است ناشی فرار بوته‌های حساس به بوته‌های مقاوم یا ناشی از ناخالصی در بوته‌های مقاوم باشد). بنابراین Amiri و همکاران (۲۰۰۹) (۱۹) بوته‌های نوترکیب در جمعیت حساس را در ۲ ضرب کردند.

$$\text{Distance } \textcircled{R} = \frac{\text{Susceptible without band} \times 2}{\text{Total individuals}}$$

R=repulsin

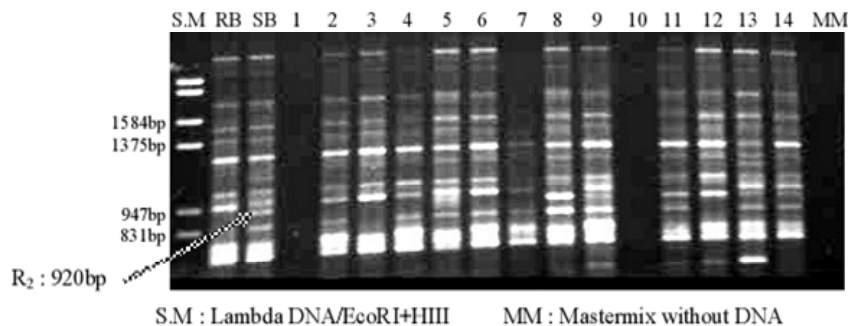
(۱۹):

$$\text{Distance } \textcircled{C} = \frac{\text{Resistant without band} + \text{susceptible with band}}{\text{Total individuals}}$$

c=coupling

(۱۸):

نتایج شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته به ژن مقاومت به ریزومانیا *Rz* برای شناسایی نشانگرهای RAPD پیوسته به ژن مقاومت به ریزومانیا دو توده از مقاوم‌ترین و حساس‌ترین گیاهان حاصل از تفرق خانواده -Holly 1-4 تهیه گردید. ۲۱۵ ترکیب جفت آغازگر روی هر یک از توده‌ها آزمایش شدند. حدود ۲/۵ درصد ترکیبات جفت آغازگر، مخلوط‌های دو DNA را تکثیر نکردند. ۳۴ ترکیب حداقل یک نوار در توده مقاوم یا حساس تکثیر کردند که در دیگری وجود نداشت. با آزمایش‌های بیشتر فقط ۴ ترکیب جفت آغازگر، ایجاد یک نوار چندشکل نمودند که تکرارپذیر و مرتبط با مقاومت بود. آغازگرهای این ۴ ترکیب عبارت بودند از (MF₃,MF₄-r(~920)؛ MF₈,MF₁₁-c-؛ MF₇,MF₈-c(~1220) و MF₁₂,MF₇-c(~1475) که نشانگرهای آن‌ها به ترتیب R2، C2، C5 و C6 نام‌گذاری شدند. نشانگر اول یک نوار در موقعیت ناجفت و سه نشانگر دیگر یک نوار در موقعیت جفت نشان دادند. فاصله R2 و C2 از ژن *RzI* با استفاده از روش فراوانی بوته‌های نوترکیب به ترتیب ۸/۳ و ۳۲/۸۷ سانتی‌مورگان بود. دوتا از نشانگرها (C6=51.9cM و C5=43.7cM) در موقعیت جفت به علت فاصله زیادشان تا ژن *RzI* پیوستگی زیادی نشان ندادند و بنابراین از محاسبه با Mapmaker کنار گذاشته شدند. همانطور که در تصویر ۱ نشان داده شده است نشانگر R2 نوری با اندازه حدوداً ۹۲۰ جفت باز در توده مقاوم و گیاهان تشکیل‌دهنده این توده ایجاد نمود. هیچ محصولی در ستون نمونه‌های شماره ۱ و ۱۰ مشاهده نمی‌شود.



تصویر ۱ - حضور نشانگر RAPD (*R2*) در توده مقاوم (RB)، توده حساس (SB)، تک بوته‌های مقاوم (۷-۱) و حساس (۱۴-۸)

به صورت تکی استفاده شده بودند، توده‌های مقاوم و حساس همان جمعیت را تکثیر نکردند.

چهار جفت ترکیب آغازگری در جمعیت نوار چند شکل تولید نمودند که دو تا از آنها (C5 و C6) به علت فاصله بیش از ۴۰ سانتی‌مورگان از ژن *Rz1* مورد بررسی قرار نگرفتند. نشانگر C2 نیز به علت این که دارای χ^2 معنی‌دار در سطح ۱ درصد بود کنار گذاشته شد. انحراف تفرق ممکن است بر اثر حذف انتخابی گامت‌های نر در نتیجهٔ عقیمی دانه‌های گرده یا خود ناسازگاری، حذف انتخابی گامت‌های ماده (۲۴) و یا بر اثر تفاوت‌های شایستگی بین زیگوت‌ها باشد (۲۵). همانطور که مشاهده می‌شود فواصل ژنتیکی به دست آمده با استفاده از روش تک‌بوته‌های نوترکیب، بسیار کمتر از فاصلهٔ به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Mapmaker است. این تفاوت توسط امیری و سرافراز (۱۳۸۶) (۲۶) نیز بیان شده است. آن‌ها نشان دادند که اگر نشانگر و ژن به صورت جفت پیوسته باشند، فاصلهٔ محاسبه‌شده با استفاده از فراوانی بوته‌های نوترکیب، با فاصلهٔ به دست آمده از نرم‌افزار هم‌خوانی دارد، اما اگر نشانگر در حالت ناجفت با ژن مربوطه پیوسته باشد، نتایج حاصل از نرم‌افزار و تابع درست‌نمایی تقریباً یکسان، اما تفاوت زیادی با فاصلهٔ محاسبه‌شده با استفاده از فراوانی بوته‌های نوترکیب خواهد داشت. اگر جمعیت F_2 و نشانگر از نوع غالب باشد (مانند RAPD)، برای نشانگرهای ناجفت شناسایی شده، فاصلهٔ حاصل از تابع درست‌نمایی و نرم‌افزار Mapmaker به شدت اریب است و در این حالت، روش فراوانی بوته‌های نوترکیب، نتایج نارایی به دست می‌دهد. برای محاسبه فرمول فراوانی نوترکیبی، Mapmaker از تابع درست‌نمایی T مشتق گرفته و آن را برابر صفر قرار می‌دهد. اگر نشانگر ناجفت باشد، فراوانی نوترکیبی تنها تحت‌تاثیر فراوانی گروه چهارم فنوتیپی (گیاهان حساس فاقد نشانگر یا به عبارت دیگر، ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب مضاعف برای نشانگر و مکان ژنی) قرار گرفته و هر چه فراوانی این گروه کمتر باشد، میزان اریب فرمول در برآورد فراوانی نوترکیبی بیشتر خواهد بود (۱۴). بنابراین، نتیجه‌گیری شد که برآوردهای قبلی (یعنی نتایج

فواصل ژنتیکی و ترتیب نشانگرهای R2 و C2 توسط نرم‌افزار Mapmaker version 3.0 نیز محاسبه شد (جدول ۱).

جدول ۱- ترتیب و فاصلهٔ نشانگرها از یکدیگر و از ژن *Rz* با استفاده از mapmaker version 3.0.

Markers	Distance
R2	34.8 cM
Gene	33.3 cM
C2	-----
68.1 cM 3 markers log-likelihood=-80.35	

این نشانگرها در یک گروه پیوستگی قرار داشتند. مقدار χ^2 برای R2 معنی‌دار نبود و بنابراین از نسبت ۱:۳ تبعیت می‌نمود. ولی این مقدار برای C2 در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و از نسبت ۱:۳ مندلی تبعیت نمی‌کرد. برای تعیین نقشهٔ ژنتیکی، تجزیهٔ پیوستگی نشانگرهای پیوسته به ژن مقاومت انجام گرفت. تجزیهٔ پیوستگی بر اساس آزمون انحراف تفرق همزمان دو مکان از نسبت‌های مورد انتظار مندلی است. این انحراف می‌تواند ناشی از پیوستگی فیزیکی بین دو مکان ژنی یا انحراف تفرق در تک‌تک مکان‌ها باشد. بنابراین، برای افزایش دقت در برآورد پیوستگی بین نشانگرها، نشانگر دارای انحراف از تفکیک مندلی (C2) از تجزیه‌های بعدی حذف شد. حذف C2 اثری بر گروه پیوستگی نداشت، اما فاصلهٔ نشانگر R2 نسبت به ژن کاهش یافت.

جدول ۲- ترتیب و فاصلهٔ نشانگرها از یکدیگر و از ژن *Rz* با استفاده از mapmaker version 3.0.

Markers	Distance
gene	23.7 cM
R2	
23.7 cM 2 markers log-likelihood=-45.25	

بحث

استفاده از ترکیبات جفت آغازگر در یافتن چندشکلی، مؤثرتر از کاربرد تک آغازگر بود. در این تحقیق تنها ۲/۵ درصد از جفت آغازگرها، توده‌های مقاوم و حساس را تکثیر نکردند، در حالی که ۱۸ درصد و ۲۴ درصد از همان آغازگرها که به ترتیب توسط امیری (۱۳۸۲) (۱۴) و مصباح (۱۳۸۶) (۲۳)

این تحقیق از نظر مالی توسط مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند حمایت گردید. همچنین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران با برخی کمک‌های علمی از این تحقیق حمایت کردند. از جناب آقای دکتر محمودی در بخش گیاه‌پزشکی این مؤسسه به خاطر تذکرات و کمک‌های برادرانه کمال قدردانی را داریم.

به‌دست آمده از فراوانی بوته‌های نوترکیب) به‌علت کم‌بودن تعداد گیاهان حساس فاقد نشانگر (یک گیاه) صحیح بود و نتایج حاصل از نرم‌افزار به‌علت کم‌بودن فراوانی گیاهان حساس فاقد نشانگر برای نشانگرهای ناجفت به شدت اریب است.

تشکر و قدردانی

منابع مورد استفاده

۱. امیری، ر. ۱۳۸۲. تعیین مارکرهای مولکولی پیوسته با ژن یا ژن‌های مقاومت به ریزومانیا جهت ارزیابی سریع ژرم‌پلاسم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند. ص ۳۲.
۲. امیری، ر. سرفراز، و ع. ۱۳۸۶. مقایسه فراوانی بوته‌های نوترکیب، تابع درست‌نمایی و نرم‌افزار Mapmaker برای برآورد فاصله نشانگرهای
۳. مصباح، م. ۱۳۸۶. شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژنهای مقاومت به ریزومانیا جهت ارزیابی سریع ژرم‌پلاسم چغندر قند. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند. ص ۴۴.
4. Amiri, R., Mesbah, M., Moghaddan, M., Bihamta, M. R., Mohammadi, S. A., Norouzi, P., 2009. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris*. *Biologia Plantarum*. 53: 112-119.
5. Amiri, R., Moghaddan, M., Mesbah, M., Sadeghian, S. Y., Ghannadha, M. R., Izadpanah, K., 2003. 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* 132: 363-373.
6. Asher, M. J. C., 1993. Rhizomania. In: Cooke, D.A. & Scott, R.K. (eds) *The sugar beet crop, Science into practice*. Chapman & Hall, London, pp. 311-346.
7. Barzen, E., Mechelke, W., Ritter, E., Seitzer, J. F., Salamini, F., 1992. RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogerm and hypocotyl colour. *Plant J* 2: 601-611.
8. Biancardi, E., Lewellen, R. T., de Biaggi, M., Erichsen, A. W., Stevanato, P., 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 127: 383-397.
9. Canova, A., 1959. Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore Fitopatologico* 9: 390-396.
10. Cooke, D. A., Scott, r. K., 1993. *The sugar Beet Crop. Science into Practice*. Chapman and Hall, Publishers. Pp. 675.
11. Joersbo, M., Pua, E. C., Davey, M. R., 2007. Sugarbeet. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 59, Transgenic Crops IV*. pp. 355-379. Eds., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
12. Keskin, B., 1964. *Polymyxa betae n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von Beta vulgaris Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe*. *Arch Mikrobiol* 49: 348-374.
13. Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, I., Barlow, A., Daley, M. J., Lincoln, S. E., Newburg, L., 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
14. Lewellen, R. T., 1995. Performance of near-isolines of sugar beet with resistance to rhizomania from different sources. In: *Proc 58th IIRB cong*, pp. 83-92.
15. Masuda, T., Kagawa, K., Kanzawa, K., 1969. Studies on succession cropping of sugar beets. 1. Some observations of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. *Bull Sugarbeet Res Suppl* 11: 77-84.
16. Mesbah M., 2008. Identification of molecular markers linked to rhizomania

- resistance genes for rapid screening of sugar beet germplasm. Final report. Sugar Beet Seed Institute, Karaj, Iran. 44p (in Persian).
17. Michelmore R. W., Paran, I., Kesseli, R. V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregate analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using a segregating population. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828–9832.
 18. Murry, M. G., Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. 8: 4321-4325.
 19. Novy, R. G., Vorsa, N., 1996. Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry: implication for pedigree and genetic-relatedness studies and a source of co-dominant RAPD markers. Theor Appl Genet 92: 840-849.
 20. Nouhi, A., Amiri, R., Haghazari, A., Saba, J., Mesbah, M., 2008. Tagging of resistance gene(s) to rhizomania disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). African Journal of Biotechnology 7: 430-433.
 21. Pelsy, F., Merdinoglu, D., 1996. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. Plant Breeding 115: 371-377.
 22. Richards, K., Jonard, G., Guilley, H., Ziegler, V., Putz, C., 1985. In vitro translation of beet necrotic yellow vein virus RNA and studies of sequence homology among the RNA species using cloned cDNA probes. J Gen Virol 66: 345-350.
 23. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
 24. Scholten, O. E., Jansen, R. C., Keizer, L. C. P., De Bock, T. S. M., Lange, W., 1996. Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. Euphytica 91: 331-339.
 25. Scholten, O. E., Lange, W., 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica 112: 219–231.
 26. Steel, R. G. D., Torrie, J. H., 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. Mc Graw- Hill, Inc, New York.
 27. Subudhi, P. K., Huang, N., 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.
 28. Tamada, T., 1975. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 144, pp. 4.
 29. Van den Broecke, A., Riek, J. D., Roldan-Ruiz, I., Wauters, A., Van Bockstaele, E., De Loose, M., 1998. DNA markers: a tool for plant variety description, recognition and stability testing. Proceedings of the 61 st IIRB Congress, Brussels, pp. 151-165.
 30. 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.
 31. Whitney, E. D., 1989. Identification, distribution, and testing for resistance to Rhizomania in *Beta maritima*. Plant Dis 73: 287-290.