

بررسی امکان دستیابی به گزینش به کمک نشانگر برای صفت مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

مرضیه شازده احمدی^{۱*}، سپیده ترابی^۲، محمد رضا صلواتی میدی^۳، حمید عبدالله^۴،
ملیحه ملکی^۵، ناهید معرف زاده^۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- محققین مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر

۳- استادیار، موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Noshinshazdeahmadi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

توتون، یکی از گیاهان مهم زراعی و صنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولید کننده نقش بسیار مهمی دارد. بیماری ویروس Y سیب زمینی (PVY) یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی خسارات زا بر روی توتون می‌باشد و سبب کاهش کمیت و کیفیت محصول توتون می‌شود. بهترین و اقتصادی ترین روش کنترل بیماری PVY، تولید ارقام مقاوم است. اصلاح برای مقاومت به این بیماری از طریق روش‌های کلاسیک، مشکل و مستلزم صرف هزینه‌های زیادی است. نشانگرهای DNA پیوسته با ذن‌های مقاومت و دارای چندشکلی زیاد (مانند نشانگرهای SSR) می‌توانند در تسريع برنامه‌های اصلاح ارقام مقاوم مفید باشند. این مطالعه به منظور بررسی امکان دستیابی به گزینش به کمک نشانگر (MAS) برای صفت مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از نشانگر های SSR اجرا شد. بدین منظور در فروردین ماه ۱۳۸۹ کاشت بذور والدین، یعنی رقم VAM به عنوان والد مقاوم به PVY و رقم K326 به عنوان والد حساس به PVY صورت گرفت. DNA والد مقاوم و والد حساس به بیماری PVY به طور جداگانه استخراج شد و ۱۰۰ جفت آغازگر SSR بر روی DNA والد مقاوم و والد حساس به طور جداگانه آزمون شدند و بعد از انجام الکتروفورز عمودی و رتک آمیزی ژل با نیترات نقره، از بین آنها ۲۸ نشانگر که دارای بیشترین چندشکلی بر روی والدین بودند، انتخاب و غربال شدند، سپس این ۲۸ نشانگر بر روی بالک مقاوم و بالک حساس به بیماری PVY مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۳ نشانگر SSR به نام‌های (PT20357)، (PT20165)، (PT30002) دارای بیشترین چندشکلی بر روی بالک های مقاوم و حساس به PVY بودند. این نشانگرهای می‌توانند در امر گزینش به کمک نشانگر (MAS) در مقاومت به بیماری PVY در توتون مدنظر قرار گرفته و مفید باشند.

واژه‌های کلیدی

بالک،

توتون،

نشانگرهای SSR

MAS

PVY

مقدمه

توتون یکی از گیاهان مهم زراعی و صنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولید کننده نقش بسیار مهمی دارد (khajepoor 2004). توتون گیاهی یکساله و از خانواده بادمجانیان و از جنس نیکوتینا می‌باشد که به صورت بوته ای بزرگ و استوار رشد می‌کند و برای استفاده تجاری از برگهایش استفاده می‌شود(Ahifar 1998). ویروس Y سیب زمینی (PVY) متعلق به جنس پوتی ویروس است که گیاهان خانواده سولانا سه مانند سیب زمینی، توتون، گوجه فرنگی و فلفل را آلوده می‌کند(Tian et al. 2011).

بالای چندشکلی برای شناسایی ۱۰ واریته از توتون های کشت شده در ایالت Macedonian استفاده شد که از بین آنها ۱۴ مارکر دارای بیشترین چندشکلی بودند. آنها به منظور اندازه گیری تنوع ژنتیکی و هتروزیگوستی، شاخص شانون را محاسبه کردند. بیشترین مقدار این شاخص و بیشترین میزان میزان تنوع ژنتیکی را آغازگر XAM07(1/5175) و کمترین میزان آنرا آغازگر Czubacka and XAM13(0/5623) به خود اختصاص داد. Doroszewska (2009)، در نتیجه تحقیقات خود، توتون دابل هاپلوبئیدی را ایجاد کردند که دارای منابع مختلف مقاومت به بیماری PVY می باشد. آنها دریافتند که یکی از منابع مقاومت به PVY، گونه وحشی توتون به نام *Nicotiana africana* می باشد. منبع دیگر مقاومت به PVY، لاین های ترانسژنیک توتون به نام MN 944-LMV و کولتیوار Mac Nair هستند که دارای ژن Bindler et al. (2007) پروتئین پوششی *LMV CP⁺* یا *LMV CP* هستند. *Nicotiana tabacum* (L.) را با استفاده از نشانگرهای SSR ایجاد کردند. این مطالعه با استفاده از ۲۱۰ مارکر SSR و با هدف ایجاد نقشه ژنتیکی بسیار بزرگی از توتون برای ایجاد ژنوم تترالوبئید انجام گرفت. این نقشه ژنتیکی با استفاده از مکان یابی جمعیت به دست آمده از تلاقی بین واریته ای Hicks Broad Leaf × Red Russian (Brigentti et al. 1998)، با استفاده از نشانگرهای AFLP شد. مکان یابی مولکولی ژن مقاومت به بیماری PVY (ژن *Ry sto*) در گیاه سبب زمینی شده است. آنها دریافتند که ژن *Ry sto* یک ژن غالب است که مقاومت به بیماری PVY را در گیاه سبب زمینی ایجاد می کند. (Sabir (2010) از مارکر RAPD و مارکرهای پروتئینی برای بررسی مقاومت به ویروس Y سبب زمینی در کولتیوارهای سبب زمینی استفاده کردند. آنها برای انجام تحقیق خود، ۹ کولتیوار سبب زمینی را در ۳ فصل متواتی کاشتند و با انجام تست الیزا آنها را بر حسب ظهور علائم آلودگی به PVY طبقه بندی کردند. آنها در این تحقیق از روش (SDS-PAGE) و ۶۰ مارکر RAPD برای شناسایی کولتیوارهای مقاوم و شناسایی نشانگرهای پیوسته به بیماری PVY استفاده کردند. مشخص شد که از بین آنها، ۴ نشانگر چندشکلی بالایی (در حدود ۷۵ درصد) را نشان دادند، به طوریکه نشانگر (XZ 33) دارای بیشترین درصد

PVY یکی از مهمترین بیماری های ویروسی خسارت زا بر روی توتون است که لکه های نکروتیک یا (قهوه ای شدن رگبرگها)، نواری شدن رگبرگها، علائم موzaیکی و ایجاد نقاط حلقوی نکروزه بروی برگهای توتون از علائم آن است و باعث کاهش (shou et al. 2011;Reynolds 1991). میزان خسارت ویروس Y سبب زمینی بر روی گیاه توتون تا ۷۵ درصد ذکر شده است که به عوامل متعددی از جمله رقم توتون، زمان وقوع آلودگی و سویه ویروس بستگی دارد (Mahtabi,R 1999). بهترین روش کنترل بیماری PVY تولید ارقام مقاوم است، به همین دلیل شناسایی ژن های مقاومت به بیماری PVY با استفاده از نشانگرهای مولکولی، روشی سریع و راحت بوده و کمک زیادی به تولید ارقام مقاوم می کند (Dinant et al. 1993). یکی از بهترین و سریع ترین نشانگرهای مولکولی در بررسی چندشکلی، نشانگر SSR می باشد. نشانگرهای SSR در ژنوم تمام یوکاریوت ها وجود دارند (Li et al. 2010) SSR ها به دلیل فراوانی زیادشان برای مکان یابی ژنتیکی و مطالعه جمعیت، نشانگرهای ایده آلی هستند و استفاده از آنها بسیار ساده و آسان است(Naghavi et al. 2005). Gupton and Burk (1973) بررسی شده است. آنها بین رقم ویرجینیا A جهش یافته به عنوان والد نر و ۲۴ مونوسومی توتون تلاقی انجام دادند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که احتمالا مقاومت به بیماری PVY در توتون، به یک ژن بر روی کروموزوم E مربوط می شود. (Rodal and xiong 2008) محل عامل مقاومت به بیماری PVY توسط کننده دوام مقاومت به ویروس Y سبب زمینی را در توتون ویرجینیا A موتانت بررسی کردند. آنها دریافتند که توتون رقم VAM و رقم NC 745 حامل ژن *Va* هستند که این ژن سبب ایجاد مقاومت به بیماری PVY در توتون می شود. نتایج تجزیه و تحلیل ژنتیکی بر روی نتاج هیریید نشان داد که مقاومت توتون رقم VAM نسبت به بیماری PVY، حداقل به وسیله دو ژن مغلوب به نام ژن *Va* و *Va2* تعیین می شود. (Davalieva et al. 2010) در بررسی تنوع ژنتیکی واریته های توتون ایالت Macedonian آمریکا از نشانگرهای SSR استفاده کردند. در این تحقیق از ۷۰ مارکر ریزماهواره (SSR) به دلیل داشتن سطوح

(Fuentes et al. 2000). چنانچه پیوستگی شدیدی بین مکان ژنی نشانگر و مکان ژنی کترل کننده آن وجود داشته باشد، اصلاحگران می توانند از نشانگرهای مولکولی جهت انتخاب غیر مستقیم افراد در جمعیت های در حال تفرق که ژن را برای یک صفت مطلوب حمل می کنند، استفاده کنند (Cernak et al. 2008). هدف از این تحقیق، بررسی امکان دستیابی به انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای صفت مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از مارکرهای SSR بود. روش انتخاب به کمک نشانگر در کنار ارزیابی چندشکلی والدین و همچنین ارزیابی چند شکلی بالک های مقاوم و حساس به بیماری PVY در توتون یک راهبرد کارا برای تسهیل ژن های مقاومت به شمار می رود، زیرا در مقایسه با تعیین ژنتیپ جمعیت با تعداد زیادی از نشانگرها، موجب صرفه جویی در زمان و هزینه می شود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل برگ های جوان گیاهان مقاوم به بیماری PVY (رقم VAM) و رقم حساس به بیماری PVY (رقم K326) در توتون بود. بذور این گیاهان در فوردهای ۱۳۸۹ در گلخانه کشت شد و در مرحله ۳ برگی از آنها نمونه گیری انجام شد. نمونه ها در ازت مایع منجمد شد و در فریزر -۸۰- نگهداری شد. سپس از تلاقی رقم VAM × رقم K326 در مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، یک جمعیت F2 تهیه شد و ۱۰۰ بذر F2 حاصل از تلاقی رقم VAM×K326 در خزانه کاشته شدند و با عصاره ویروس Y سبب زمینی مایه ژنی شدند و با انجام تست الایزا و بررسی و تایید کامل مقاومت و حساسیت بوته های F2 نسبت به بیماری PVY، تعداد ۱۰ بوته کاملا مقاوم و ۱۰ بوته کاملا حساس به PVY انتخاب شدند و از هر کدام از آنها به طور جداگانه نمونه برگ تهیه شد.

استخراج DNA

DNA ژنومی از برگ های والد مقاوم و والد حساس به بیماری PVY و همچنین DNA ژنومی از برگ های هریک از ۱۰ بوته کاملا مقاوم و ۱۰ بوته کاملا حساس به بیماری PVY به طور جداگانه با استفاده از روش (Delaporta et al. 1983) استخراج

چندشکلی (۹۰ درصد) و نشانگر (XZ61) دارای کمترین چند شکلی (۴۰ درصد) بود (Yao Zhang et al. 2008)، تنوع ژنتیکی کولتیوارهای توتون را توسط مارکرهای RAPD و AFLP بررسی کردند. ارزیابی تنوع ژنتیکی کولتیوارهای توتون در اصلاح و بهبود عملکرد توتون در دراز مدت اهمیت دارد. آنها روابط خویشاوندی کولتیوارهای توتون را توسط تجزیه خوش ای (UPGMA) بر پایه داده های RAPD و AFLP برآورد و تخمین زدند. Keiichi and Akira (2004) Y سبب زمینی را در توتون بارلی در ژاپن کشف کردند. دو ایزوله A-1 و A-2 بر روی برگهای توتون بارلی ایجاد لکه های زرد یا نقاط حلقوی نکروزه قهوه ای و علائم سیستمیک می کنند. آنها در این تحقیق، محل های غیرفعال برگ نسبت به PVY را با ایزوله های A-1 به مدت ۱۰ دقیقه آلووه کردند و آنها را ۵-۶ روز در محیط *in vitro* قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که آنتی سرم تهیه شده به وسیله ایزوله A-1، واکنش مثبت نسبت به آلووه گیاه نشان داد. مشخص شد که ایزوله A-1 از ویروس Y سبب (Hu et al. 2009) زمینی به گروهی از نژادهای نکروتیک PVY تعلق دارد. در نتیجه تحقیقات خود دریافتند که یک نژاد نوترکیب جدید از PVY، ایجاد عوامل ژنتیکی جدید ویروسی و نکروز آوندی برروی توتون می کند و لاین L26 دارای علائم موزاییکی و روشن شدن رگبرگها برروی توتون می باشد و نژاد PVY NTN ایجاد نکروز آوندی بر روی توتون می کند. مشخص شد که دو آمینواسید از ژنوم آنها در ایجاد علائم نکروز آوندی در توتون نقش دارند که این دو آمینواسید در ناحیه C-ترمینال از HC-Pro این جایه قرار دارند. نشانگرهای مولکولی پیوسته به صفات مهم زراعی، بازده اصلاح این گیاهان را به طور قابل ملاحظه ای افزایش داده است (Naghavi et al. 2005). نشانگر مولکولی برای یک ژن خاص، قسمتی از DNA است که کاملا به یک ژن پیوسته می باشد. بنابر این هر گیاه که حاوی یک نشانگر خاص باشد، حاوی ژن پیوسته به آن نیز خواهد بود (Najafi et al. 2009). چنانچه صفاتی مانند مقاومت به بیماری ها را بتوان به وسیله پیوستگی با نشانگرهای مولکولی نشانمند نمود، زمان و هزینه لازم برای انتقال این ژن ها از یک زمینه ژنتیکی به دیگری و بنابر این بهبود ارقام مقاوم به شدت کاهش خواهد یافت

نگهداری در دمای 37°C ، آنتی بادی پلی کلونال اضافه با برگرداندن سریع پلیت الایزا خارج شد و چاهک ها ۳ بار و هر phosphate Buffer Saline (PBST) باfer به مدت ۳-۵ دقیقه باfer phosphate Buffer Saline (PBST) شستشو داده شدند. سپس به Tween 20 (شستشو داده شدندو سپس خشک شدند. سپس به هر یک از چاهک های پلیت الایزا ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بافت آلوهه اضافه شد و در تعدادی از چاهک ها فقط باfer استخراج، در برخی گیاه آلوهه به عنوان شاهد مثبت و در برخی گیاه سالم به عنوان شاهد منفی ریخته شد. بعد از یک شب نگهداری در دمای 4°C ، پلیت خالی شده و طبق مراحل قبل شستشو داده شد. آنتی بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز در باfer کانجوگه (conjugate) حل شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک پلیت افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C نگهداری شد. سپس یک میلی گرم در یک میلی لیتر از محلول پارانیتروفنیل فسفات در باfer زمینه تهیه شد و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد و تا ظهور رنگ زرد در برخی از چاهک ها در دمای اتاق نگهداری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از نشانگرهای SSR توتون

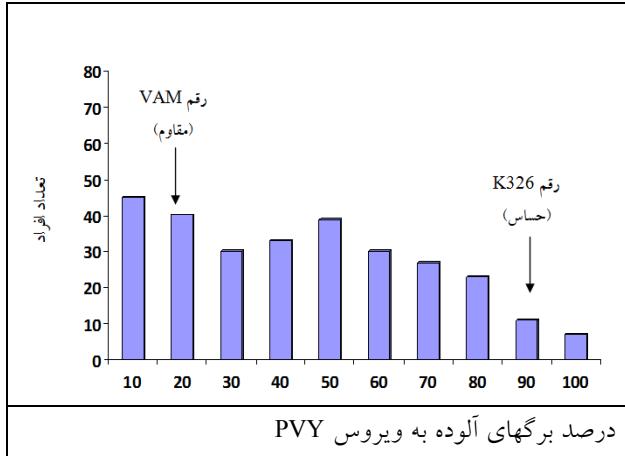
برای ایجاد بهترین شرایط PCR، غلظت های مناسب نمک، آغازگر و DNA توسط آزمون گرادیان غلظت تعیین گردید. حجم کلی واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر می باشد که شامل یک میکرولیتر ۰/۲۳ ng/ μl DNA ژنومی (μl)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۰/۲۵ میکرولیتر (۴۶ میلی مولار) آنزیم Taq DNA Polymerase و ۰/۷ PCR buffer میکرولیتر از PCR buffer ۱۵ میکرولیتر آب مقتدر استریل و ۱/۵ میکرولیتر آغازگر مربوط به هر یک از مارکرهای SSR توتون. (سامی ۱۰۰ آغازگر SSR و توالی های آنها در جدول ۱ آورده شده است). این مواد به طور جداگانه به هر یک از تیوب های کوچک $0/2 \text{ ml}$ متقل شدند و در داخل دستگاه PCR قرار گرفتند. استخراج شده هر یک از والدین مقاوم و حساس، PCR به طور جداگانه توسط ۱۰۰ نشانگر توتون مورد آزمون قرار گرفتند. برنامه PCR شامل دناتوره کردن ابتدایی در 94°C برای ۵ دقیقه، به دنبال آن 35 سیکل تکثیری شامل مرحله دناتوره کردن در 94°C برای یک دقیقه، اتصال آغازگر در 55°C برای 45 ثانیه، تکثیر DNA در 72°C برای یک دقیقه و بعد از آن مرحله تکثیر

شد. برای استخراج DNA در حدود ۲-۳ گرم برگ از هر نمونه تهیه شد. برگها با نیتروژن مایع در هاون چینی ساییده شدند و مقداری از برگهای ساییده شده به میکروتیوب های $1/5 \text{ ml}$ متقل شد. سپس مقدار ۴۰۰ میکرولیتر باfer استخراج مخصوص دلاپورتا که از قبل در بن ماری تا دمای 65°C گرم شده بود به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه ها مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار اضافه شد و میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C قرار گرفتند. سپس DNA توسط محلول کلروفرم : ایزوآمیل الکل جدا شد و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند و محلول روئی آنها دور انداخته شد. سپس، DNA ها با الکل اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند و به مدت ۱-۲ ساعت در معرض دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند. در آخر برای حل شدن کامل DNA، رسوب های حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر باfer TE (Tris-EDTA) حل شدند. سپس، میکروتیوب ها به مدت یک شب در یخچال معمولی در دمای 4°C قرار داده شدند. پس از حل شدن کامل DNA، برای ارزیابی کمیت DNA غلظت های DNA استخراج شده والد مقاوم و والد حساس به PVY، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و با طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و تعیین شد. ارزیابی کیفیت DNA های استخراج شده توسط الکتروفورز افقی ژل آکاروز ۰/۸ درصد انجام شد.

تست الیزا

بعد از انتقال نشاهای گیاهان F_2 به زمین اصلی و رسیدن به مرحله ۴-۵ برگی، مایه زنی با عصاره ویروس Y سیب زمینی صورت گرفت. ارزیابی گیاهان مایه زنی شده هر هفته یکبار تا یک ماه پس از مایه زنی انجام شد. جهت تایید آلدگی یا عدم آلدگی بوته ها به PVY، بوته ها با آزمون دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) مطابق روش Kelark and Adamz (1977) با استفاده از آنتی بادی چند همسانه ای (POLYCLONAL) ویروس Y سیب زمینی مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا آنتی بادی پلی کلونال IgG در باfer پوششی حل شده و به وسیله میکروپیپت، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر یک از چاهک های پلیت الایزا افزوده شد. بعد از

رنگ پلیت، نشان دهنده پاسخ منفی واکنش نسبت به PVY بود و چاهک های زرد رنگ پلیت، نشان دهنده پاسخ مثبت واکنش نسبت به PVY بود (شکل ۲).



شکل ۱- توزیع فتوتیپی شدت بیماری PVY در گیاهان F_2 در بین ارقام مقاوم و حساس



شکل ۲- نتایج ارزیابی بیماری PVY با تست الیزا در نتاج F_2

تجزیه نشانگرهای SSR با انجام الکتروفورز عمودی پس از رنگ آمیزی و ثبت ژل ها، اطلاعات به دست آمده برای هر جفت آغازگر با توجه به وجود و عدم وجود هر باند امتیاز دهی انجام شد. نتایج نشان داد که از بین ۱۰۰ جفت آغازگر مورد استفاده که فرآورده های PCR آنها، بر روی ژل پلی آکریلامید و اسرشته ساز ۶ درصد الکتروفورز شده و ژل ها با محلول نیترات نقره رنگ آمیزی شدند، تنها ۲۸ جفت آغازگر SSR توانستند الگوی نواریندی متفاوتی را برای هر نشانگر در بین والدین مقاوم و حساس به PVY نشان دهند. (اسمی این نشانگرها و وزن آلل های آنها در جدول ۲ آورده شده است و در شکل ۱ الگوی چند

نهایی در 72°C برای ۸ دقیقه انجام شد (لازم به ذکر است که دمای مرحله اتصال آغازگر برای هر نشانگر با توجه به توالی آن در نظر گرفته شد) و بعد از اتمام مراحل PCR، مقدار ۷ میکرولیتر رنگ بارگذاری درون محصولات PCR به اضافه ۱/۵ میکرولیتر رنگ با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و کیفیت باندهای آن بررسی گردید.

الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی ژل فرآورده های PCR ۱۰۰ نشانگر SSR توتوون که به طور جداگانه با DNA هر یک از والدین مقاوم و حساس انجام شده بود بر روی ژل های پلی آکریلامید و اسرشته ساز ۶ درصد الکتروفورز شدند و در آخر بر روی شیشه ها توسط مراحل مختلف رنگ آمیزی، باندهایی مربوط به الگوی چند شکلی نشانگر های SSR در بین والدین مقاوم (R) و حساس (S) در کنار یکدیگر ظاهر شد و چند شکلی آنها بررسی شد (شکل ۳). سپس، همین کار با ۲۸ نشانگر SSR توتوون بر روی بالک های مقاوم و حساس انجام شد و چند شکلی نشانگر ها بررسی شد.

نتایج و بحث

ارزیابی مورفولوژیکی بیماری PVY در والدین و در نتاج F_2 ارزیابی بیماری PVY بر روی ارقام مقاوم و ارقام حساس هر ۱۰ روز یکبار انجام گرفت. والدین از نظر شدت بیماری تفاوت معنی دار نشان دادند، به طوریکه والد مقاوم (رقم VAM) دارای کمترین میزان شدت بیماری بود و والد حساس (رقم K326) دارای بیشترین میزان شدت بیماری PVY بود. سه عامل محیطی افزایش دما، رطوبت و نور، عوامل موثر و مهم در شروع و گسترش بیماری PVY در توتوون هستند. همچنین شدت بیماری PVY در نتاج F_2 دارای توزیع پیوسته و دامنه ای بین ۴ تا ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده تنوع فتوتیپی وسیع در این جمعیت بود (شکل ۱).

ارزیابی بیماری PVY با تست الیزا در نتاج F_2 نتایج آزمون الیزا بر اساس تغییر رنگ چاهک ها (از بی رنگ تا زرد رنگ) پس از ۳۰ الی ۱۲۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سویسترا بررسی و ثبت گردید، به طوریکه چاهک های بدون

برروی بالک (توده)های مقاوم و حساس بودند که این ۳ نشانگرمی توانند به عنوان شاخص برای تحمل و مقاومت به بیماری PVY در توتون مدنظر قرار گیرند. (این نشانگرها در شکل ۲ مشخص شده‌اند.)

شکلی آنها مشخص شده است). با بررسی فرآورده‌های PCR نشانگر SSR توتون که بر روی بالک‌های مقاوم و حساس آزمون و الکتروفورز شده بود، با عکس برداری از آنها و بررسی چند شکلی باندها مشخص شد که تنها ۳ مارکر SSR به نام‌های (PT30002)، (PT20165)، (PT20357) دارای چندشکلی مناسبی

جدول ۱- فهرست و مشخصات صد نشانگر SSR توتون مورد استفاده در این تحقیق:

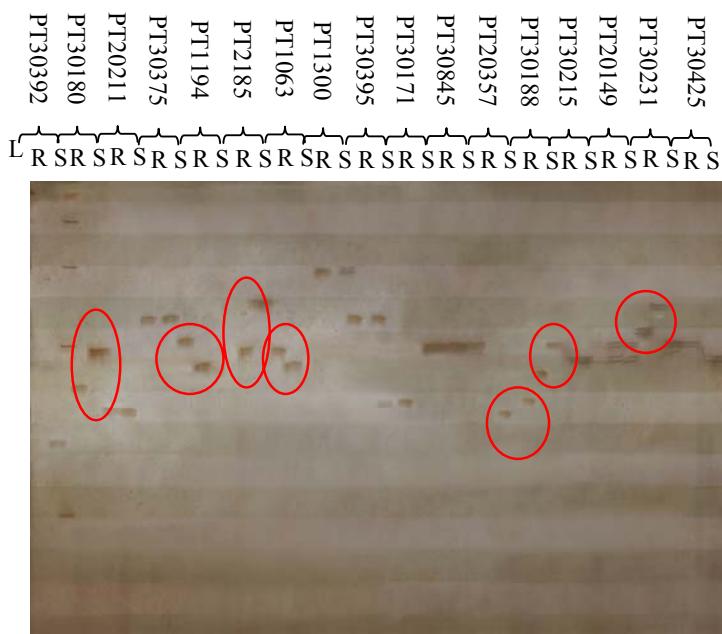
ردیف	نام آغازگر	توالی رفت (F)	توالی برگشت (R)	دمای اتصال (°C)
۱	PT30280	5'-AATTCGACGGACACTTGC-3'	5'-CCATATCTCACAGCAATCG-3'	۶۰
۲	PT20445	5'-ATGGCAAATGTTGCATCTC-3'	5'-CAAGACATGTGTCACGTGAA-3'	۶۰
۳	PT30001	5'-CATATGCTTGGAGAGTTG-3'	5'-TCATTGGTGTAGTACCTTAG-3'	۶۰
۴	PT30468	5'-AATATTGTGCTTGTAGGT-3'	5'-GGCTTAAGCACAAGCAGA-3'	۶۱
۵	PT30484	5'-TCGATTCCAGACTTCCTCC-3'	5'-TGGCCTTAGCCACTGTCC-3'	۵۹
۶	PT11903	5'-CCATAAGTCCAACATGC-3'	5'-CCTGTAACATCTGAGTGC-3'	۵۶
۷	PT20149	5'-AACAGAACCGGAAGTC-3'	5'-TCCAACAAGATGCTTCA-3'	۵۲
۸	PT40010	5'-CCATCCATGCTGCTGATA-3'	5'-GCGTGAAGCAACTAGAGA-3'	۶۳
۹	PT30180	5'-GATGATTCAAGTCTACTCA-3'	5'-CCATCCATTGCTGCTGAT-3'	۶۳
۱۰	PT20275	5'-AACAGCACCCAGCATT-3'	5'-GTTCTATTGATGCCAT-3'	۵۲
۱۱	PT20165	5'-GGAATGGAGGATCTTCGT-3'	5'-TGTCTCGTGAAGCATGAA-3'	۵۲
۱۲	PT20211	5'-GGGTTATTGCAATCGGT-3'	5'-CGCTGAAGGTTACAGGA-3'	۵۲
۱۳	PT30087	5'-TTGATGATAGACGAAG-3'	5'-CTTCTAACCGGAGGT-3'	۶۰
۱۴	PT30184	5'-TTTCCTCATGCATACCAAT-3'	5'-CCCATTCTTGTCTA-3'	۶۰
۱۵	PT1300	5'-GGAGCAAGACTCCACCT-3'	5'-ACAGACGGTAGACCTCC-3'	۵۷
۱۶	PT20176	5'-GATGGCATCTGTGAAGC-3'	5'-TGCAAGATCCGTTGTAG-3'	۵۲
۱۷	PT30170	5'-TTAAGCTATTGAGCCG-3'	5'-CGTAATGAGATTATATGCCCT-3'	۶۴
۱۸	PT30391	5'-TGTAAAGGTATCATGTCGAT-3'	5'-TCCGGTCGTAAATCTGT-3'	۶۳
۱۹	PT30388	5'-CCTTATTACCTCAGATAACAA-3'	5'-TCCATTGCAGACATAATCC-3'	۶۰
۲۰	PT30425	5'-CATAAGCATGCCACGAT-3'	5'-TCATGGTGTATAGCTGA-3'	۵۶
۲۱	PT1078	5'-AGCCCATCGTGTCAA-3'	5'-CATTGCGAGTGATTTCGT-3'	۵۶
۲۲	PT1063	5'-AGCGTTAGAAAAGTACAGATA-3'	5'-AGTCGTTAGAACTAGATAG-3'	۵۲
۲۳	PT30473	5'-TCAGCAACATCAGGAACA-3'	5'-TGCCCAGTAGGACAAGA-3'	۶۰
۲۴	PT20213	5'-TGTGGAGCTCTTCTTGC-3'	5'-TCAATCACAAATCAAT-3'	۵۶
۲۵	PT1289	5'-GGGCTGTCGTAAGT-3'	5'-ATAGTCGACGTCGCTCAC-3'	۵۲
۲۶	PT30468	5'-GGCTTAAGCAAGCAGAA-3'	5'-AATTATTGTCCTGTGTAAT-3'	۶۰
۲۷	PT30002	5'-CCATTCTCACAAGTCAA-3'	5'-TGCATGAATATCGAGGTGA-3'	۵۶
۲۸	PT20286	5'-CAAGATCCAGGCTCATCA-3'	5'-TCGACACTGCTTCGAT-3'	۵۳
۲۹	PT1244	5'-ACGATGGAGATCGTGTG-3'	5'-CCAGATACCAACTCAGC-3'	۵۲
۳۰	PT20357	5'-GGGTTGTAATGGTGTGGA-3'	5'-CCGAGCAAGCTATTGAAT-3'	۵۹
۳۱	PT30160	5'-GCCGAATAACCCAATCGC-3'	5'-ACGGATTGCTTAATGTCG-3'	۵۲
۳۲	PT30018	5'-AATTACTGTGCTGTAAGTAC-3'	5'-TCATTCAAGCATATATTG-3'	۶۳
۳۳	PT30046	5'-GATAGGTAGATACCTGTT-3'	5'-GGTGTAGCAACATCATCAA-3'	۶۳
۳۴	PT30480	5'-AAAGGAACATGGACATTG-3'	5'-TAGGCGAGATTGTGAATC-3'	۵۶
۳۵	PT30250	5'-GAACACGTTGCTCATTGC-3'	5'-ATAAGCTCTTAATTATG-3'	۶۰
۳۶	PT40023	5'-TTCGTATATGCGCAA-3'	5'-AAGCATTGTCGAT-3'	۶۰
۳۷	PT30248	5'-TGGTTGCAATGTTGAG-3'	5'-CATCCGATCGAGATTAC-3'	۵۲
۳۸	PT40009	5'-GGTCACCTGCTCTCGAG-3'	5'-CCCAATTATCACGCAAC-3'	۶۰
۳۹	PT30314	5'-TTGAGACATACAAGCGCA-3'	5'-GCAGACCCAGGATGTGTA-3'	۶۰
۴۰	PT20291	5'-AAACAACCTCACGCCCTCG-3'	5'-ACGTCTACAGCTCACC-3'	۵۲
۴۱	PT30173	5'-CCCATGGTACAGAGTATCC-3'	5'-TCACATAATCTGATCGCC-3'	۶۰
۴۲	PT20287	5'-CGCCAACACAACACTCACTTA-3'	5'-TCATGCATGTTCTCTCTT-3'	۵۹
۴۳	PT20372	5'-CCTTTACCTCACATTGCAAG-3'	5'-TAGGCTGATAGGATAGGTGC-3'	۶۰
۴۴	PT30197	5'-TTGTCATCTGCCATGTCTC-3'	5'-AAGCTGCTAGTTCTACCGA-3'	۶۰
۴۵	PT30185	5'-TGGCTGCTAGACATGGATG-3'	5'-TGCTCTCATCCACCACCGAAC-3'	۵۹
۴۶	PT30161	5'-GCGAATCTAATGCGACTAT-3'	5'-TTGCATTATCTAATGCGACT-3'	۶۰

ردیف	نام آغازگر	تولی رفت (F)	تولی برگشت (R)	دماي اتصال (°C)
۴۷	PT30028	5'-AAACCTGAAGCAGAGACGG-3'	5'-GCACATGCGATCTGATT-3'	۶۰
۴۸	PT30186	5'-GAGCCAGACAGAGCAAGA-3'	5'-GATGAATAGCTCTGAATGC-3'	۶۰
۴۹	PT30355	5'-AAGCAGAGCATTAGATGGA-3'	5'-TCCGGATCATACATTGTTGG-3'	۶۰
۵۰	PT1194	5'-CTAACACATGGACGAC-3'	5'-GAGTCCAATGACGAACG-3'	۵۲
۵۱	PT30123	5'-TGATCCTGACGCCACTT-3'	5'-GAATTCTACCAGCTGCCA-3'	۵۸
۵۲	PT30378	5'-TCAATGAGGTGTAGCCA-3'	5'-TGCATGGCTACACAAGAAG-3'	۵۸
۵۳	PT1069	5'-TGTGTTAGGTTCTGT-3'	5'-TTCTTCATTCACTACTTGTCA-3'	۶۳
۵۴	PT30332	5'-AAACCGAACCGAACTGATT-3'	5'-TCAATTATGATTCTGTACG-3'	۵۹
۵۵	PT30144	5'-TGATTGTATTGACAGCTAC-3'	5'-TTGTTAGTTACCTATTGACTT-3'	۶۳
۵۶	PT30446	5'-TGTCAAACGCAGTTGTGAG-3'	5'-TGTTCATTGGGTGTAAGG-3'	۵۹
۵۷	PT20459	5'-TCATCTGACTCTTCGA-3'	5'-TCGAGCACCAAGATA-3'	۵۲
۵۸	PT30350	5'-TTTGAATGCACATTAAGCTC-3'	5'-AAAGCTATGCAAGACCAAGA-3'	۶۰
۵۹	PT1085	5'-AGCATGTTGTCGGTGCT-3'	5'-TGGCAACACCTCAGGCTA-3'	۵۹
۶۰	PT30320	5'-TCGTGAATTATTGAACGCC-3'	5'-CACCAATAATTGGAGATGA-3'	۵۹
۶۱	PT30422	5'-AATGCCACTACGACATCTAT-3'	5'-TGAAGCGTTAACGGCAATT-3'	۶۰
۶۲	PT30399	5'-TGTGTCACCCCTCCAATT-3'	5'-TGATCTAGAGTGGCATH-3'	۵۹
۶۳	PT30156	5'-GGCAACTCTCTTGGCA-3'	5'-GGATGAACAGACAGGGACA-3'	۶۰
۶۴	PT30214	5'-TCATATTGGAAGCACAGCA-3'	5'-TCATATTGGAAGCACAGCA-3'	۵۲
۶۵	PT30175	5'-TTAGCGGGCGTATTCTTAT-3'	5'-TATGCCCTAATCCCTACGC-3'	۶۰
۶۶	PT20397	5'-GGAAGCAGAGGTGGAGA-3'	5'-TTGAGCCTTGGTCTCATGAT-3'	۵۹
۶۷	PT30111	5'-AGCCAGCACCAGTTATC-3'	5'-GGAACATGCTAAGCCTA-3'	۵۹
۶۸	PT30285	5'-CATCATGGCAAGTCACATC-3'	5'-TGCTGAAATAGCGAGTG-3'	۵۹
۶۹	PT30163	5'-CAACACACGCTCACTAGA-3'	5'-TCCTCATCCGCTAAAGG-3'	۶۰
۷۰	PT30411	5'-AACCGGGTATCGTAAGACT-3'	5'-CAATACAATCAGAATTGAG-3'	۵۹
۷۱	PT30845	5'-ACAGTCGGATCTCACCGT-3'	5'-TTCATGAATTGCTCGATGC-3'	۵۶
۷۲	PT30259	5'-CAGCCAAGAGAACCTTCAG-3'	5'-GATTACCTCAATGCCA-3'	۶۰
۷۳	PT30387	5'-GAGTTTGTAGCGGGCAAT-3'	5'-TAGCCATGCAAACCTTGACA-3'	۵۹
۷۴	PT20286	5'-ACGCTAGAGCATCCAACA-3'	5'-TAGTGAAGGCCAGCAGG-3'	۵۶
۷۵	PT30478	5'-ATTGACTCGACCTCGCAA-3'	5'-CGTCACTTCAATACACATCA-3'	۵۹
۷۶	PT30455	5'-CAGTCCGAATGATGACCG-3'	5'-TGGGCCTATGCTCAGACT-3'	۶۳
۷۷	PT10466	5'-TTGCATTCTCCCTTATCG-3'	5'-CGAATCTCAGGCCATTCTG-3'	۵۲
۷۸	PT30337	5'-TAAAGCACCTCACCTGACC-3'	5'-CCTCAAGATCCCAGATTCAA-3'	۵۶
۷۹	PT20168	5'-TAGGTTCCCTCTTCAG-3'	5'-CCCGATCCAAGAGAT-3'	۵۲
۸۰	PT30327	5'-TTGCAGCACACTATACAGT-3'	5'-GGTCAGAGATGGAAGCCA-3'	۶۰
۸۱	PT30067	5'-AACCTGGTCAGTTATCCA-3'	5'-ATTGCACCACTTAATCC-3'	۵۶
۸۲	PT20172	5'-ACACCTCCTTCTTGC-3'	5'-CCAATGGTTCACTGGA-3'	۵۲
۸۳	PT30308	5'-ATTGGGCAAATTGTAGGCA-3'	5'-TCACTGTTGTGCAACTTGAA-3'	۵۶
۸۴	PT30169	5'-CCAGGAGAGATTGTGAGAA-3'	5'-AGTGGATCCTCATCAGAA-3'	۶۰
۸۵	PT30394	5'-TCATGGTGGAAATCAATGAA-3'	5'-GGCTTGTGTTGCCATACAT-3'	۵۶
۸۶	PT30215	5'-GCAGACTGGTAGATCCGAC-3'	5'-TGGTCAGAGTTGTTCTGC-3'	۶۰
۸۷	PT30395	5'-CGATCTCATATCTATAAGT-3'	5'-GCGAAGGTAGAAGCCAAT-3'	۶۰
۸۸	PT1305	5'-GGTTGCATACCGCAATGAG-3'	5'-CGGCATGCAACTAATCCAT-3'	۵۶
۸۹	PT30171	5'-CCCATGCACTGCCATTCT-3'	5'-CCCAGAACGCTTATACAAAC-3'	۶۰
۹۰	PT40049	5'-TTCCATGAACCTAGCCGT-3'	5'-TTCCATGAACCCTAGCCGT-3'	۶۰
۹۱	PT30027	5'-CCGAGAGTTGCATTGATT-3'	5'-AGGTTCTACGCAAGAGATG-3'	۶۰
۹۲	PT1089	5'-CAGCAACCACGGATGTAG-3'	5'-CAAAGCTCCAGCAAGCATC-3'	۵۹
۹۳	PT20357	5'-GCAATGCGAACAC-3'	5'-CGAATCACATTACA-3'	۶۰
۹۴	PT30005	5'-TTTCACAGGCTTAAG-3'	5'-CCCTGAGACTCAGATT-3'	۵۲
۹۵	PT1106	5'-GTTTAACTGAACCTTAG-3'	5'-CTTAAAGCGTTACGCTCT-3'	۵۶
۹۶	PT40080	5'-AAAGCGCTTAGGATAG-3'	5'-CCAATGCGCAATGGAAT-3'	۵۲
۹۷	PT1355	5'-CCCAATGCGCATAACG-3'	5'-GGCACATGTCTCAAGCA-3'	۶۰
۹۸	PT30469	5'-GGTTCAGTGTCCATAA-3'	5'-CCAGTGTCAAGAAATTGTC-3'	۵۶
۹۹	PT20130	5'-AAATCGCGCTTAG-3'	5'-CCTGAAAAGCTGTC-3'	۵۲
۱۰۰	PT1405	5'-ATATATCTCTGCGGA-3'	5'-GGGCTTATTACAGG-3'	۶۰

جدول ۳- اسامی و مشخصات نشانگرهایی که دارای چندشکلی مناسب بر روی بالک‌های مقاوم و حساس به بیماری PVY بودند

جدول ۲- فهرست و مشخصات نشانگرهایی که دارای بیشترین چندشکلی در DNA والدین بودند :

تعداد آلل‌ها	وزن نشانگر (bp)		نشانگر
	مقاوم	حساس	
۳	۱۰۱-۱۰۶	۱۷۰	PT20357
۲	۱۵۰	۱۳۰	PT20165
۲	۲۵۰	۳۰۰	PT30002



شکل ۳- الگوی چندشکلی نشانگرهای SSR مورد استفاده بر روی والد مقاوم (VAM) و والد حساس (رقم K326) به بیماری PVY را نشان می دهد. R مربوط به والد مقاوم به بیماری PVY بوده و S مربوط به والد حساس به PVY می باشد و L مربوط به Ladder (نشانگر ۰۲۴۳) می باشد. مارکرهای دارای چند شکلی در شکل با دایره مشخص شده اند.

نشانگرهای مولکولی ابزار ارزشمندی برای به نزدیکی گیاهان و به ویژه شناسایی ژرم پلاسم و انتخاب غیر مستقیم زنها هستند. امروزه ردیابی صفات مطلوب و گزینش به کمک نشانگرهای مولکولی یا (MAS) از طریق پیوستگی (لينکاز) آنها با صفات مهم زراعی (كمی و كیفی) امکان پذیر شده است (et al.). با دانستن جایگاه يك ژن بر روی کروموزوم، Bindler 2007

تعداد آلل‌ها	وزن نشانگر (bp)		نشانگر
	مقاوم	حساس	
۳	۱۱۰-۱۱۱	۲۰۰	PT1193
۲	۱۸۰	۲۱۰	PT20021
۲	۱۵۰	۱۳۰	PT20165
۲	۲۰۵	۲۴۵	PT20172
۲	۲۴۰	۱۸۰	PT20275
۴	۱۳۰-۱۳۱	۱۱۰-۱۱۱	PT30067
۴	۲۰۰	۲۷۰	PT30338
۲	۱۴۰	۱۸۰	PT20445
۲	۲۰۵	۲۸۰	PT30005
۲	۲۵۰	۳۰۰	PT30002
۲	۱۶۰	۱۲۰	PT30021
۳	۱۰۵-۱۰۶	۱۷۰	PT20357
۲	۲۱۰	۲۹۰	PT30087
۲	۱۸۰	۲۲۰	PT30144
۳	۱۱۰-۱۱۱	۱۷۰	PT30150
۳	۱۲۰	۲۰۰-۲۰۱	PT30188
۲	۱۱۵	۱۰۵	PT30231
۲	۱۰۰	۱۵۰	PT30255
۴	۲۱۰-۲۱۱	۳۰۰-۳۰۱	PT30274
۲	۱۲۰	۱۶۰	PT30378
۲	۱۶۰	۲۲۰	PT30392
۴	۲۰۰-۲۰۱	۲۶۰-۲۶۱	PT30463
۲	۱۱۰	۱۷۰	PT30480
۲	۱۰۰	۱۵۰	PT30307
۲	۱۲۰	۲۱۰	PT40009
۲	۱۸۰	۲۳۰	PT30259
۲	۲۰۰	۲۸۰	PT1194
۲	۱۴۰	۱۲۰	PT2185

PT1193	PT2021	PT20172	PT3007	PT3038	PT20445	PT3005	PT3031	PT30255	PT30274	PT3002	PT30392	PT20165	PT30463	PT20357	PT7199
L	BR BS	L													L



شکل ۴- الگوی نوار بندی متفاوت نشانگرهای دارای بیشترین چندشکلی بر روی بالک های مقاوم و حساس به PVY (R: بالک مقاوم و S: بالک حساس). نشانگرهای دارای چندشکلی با دایره مشخص شده‌اند.

بلاست برنج پیوستگی دارد، همچنین مشخص شد که یک ژن جدید غالب به نام ژن *Xa33(t)* مقاومت به بیماری بلاست را در Shi et al. (2009) Yang et al. (2009) کولتیوار Ba7 برنج ایجاد می کند (2011)، با استفاده از روش MAS ، از تعدادی نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR برای شناسایی ژن مقاومت به ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (TSWV)، ژن 5-SW استفاده کردند. در این تحقیق، یک نشانگر SNP اختصاصی برای ژن مقاومت به بیماری TSWV (ژن 5-SW5-b) در ژرم پلاسم های مختلف گوجه فرنگی شناسایی شد (Shi et al. 2011). Ying et al. (2006)، با استفاده از روش MAS به بررسی و شناسایی نشانگرهای مولکولی برای مقاومت به بیماری زنگ برگ در گندم پرداختند. این نشانگرهای شناسایی شده می توانند برای اصلاح و بهبود مقاومت به این بیماری در برنامه های اصلاحی گندم از طریق روش MAS استفاده شوند (Ying et al. 2007). در پژوهشی، مکان یابی مولکولی ژن مقاومت به بیماری PVY (ژن *Rysto*) در سیب زمینی بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن *Rysto* یک ژن غالب است که مقاومت به بیماری PVY را در سیب زمینی ایجاد می کند (Brigentti et al. 1998). در تحقیقی که (2008) Rodal and Xiong انجام دادند، بیان کردند که توتون رقم VAM و رقم NC745 حامل ژن *Va* هستند که این ژن باعث ایجاد مقاومت توتون VAM نسبت به بیماری PVY می

می توان از نشانگرهای مجاور آن برای تایید وجود صفت در نسل های تحت گزینش استفاده کرد. این موضوع، امکان گزینش سریع و دقیق ژنتیکی های مطلوب را در مراحل اولیه رشد فراهم کرده و طول دوره به نزدیکی را کوتاه می نماید (Babiker et al. 2009). انتخاب به کمک نشانگر(MAS) برای مقاومت به آفات و بیماری ها و صفات مرتبط با کیفیت برخی گیاهان زراعی به عنوان بارزترین مثال به کارگیری معمول MAS در طرح های به نزدیک مطرح است. با این حال کاربرد های عملی نشانگرهای مولکولی مشخص کرده است که موفقیت در MAS به عواملی از جمله اساس ژنتیکی صفت مورد نظر، تعداد افراد (بوته های) مورد تجزیه و تحلیل و زمینه ژنتیکی که ژن هدف به آن انتقال خواهد یافت، بستگی دارد (Korinsak et al. 2009). روش اجازه انتخاب ژن هایی که صفات کمی و مقاومت گیاهان به آفات و بیماری ها را کنترل می کنند، فراهم می کند. اگرچه روش های مرسوم(ستی) برای ارزیابی مقاومت به آفات و بیماری ها نتوانسته اند نتایج خوبی ارائه دهند، ولی اغلب به هزینه Yang et al. (2000) Rossi et al. (2000) و زمان زیادی نیاز دارند. با استفاده از روش MAS ، نشانگرهای ریزماهواره(SSR) پیوسته به ژن مقاومت به بیماری بلاست برنج (ژن *Xa33*) را در کولتیوار 7 Ba برنج شناسایی کردند. نتایج آنالیز نهایی آنها نشان داد که نشانگر RM5509 به شدت به ژن مقاومت به بیماری

PT20357 بر روی کروموزوم ۱۲ توتون و PT30002 بر روی کروموزوم ۳ توتون قرار دارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از نظر مالی توسط مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش حمایت شد. از راهنمایی های علمی خانم دکتر سپیده ترابی و آقای مهندس محمد رضا صلواتی مبتدی که در کلیه مراحل اجرای عملی این تحقیق مرا بسیار راهنمایی کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

- Ahifar H (1998) Tobacco Botany. Publication of Tobacco products Company of Iran. 3:15-23. (In Farsi)
- Babiker E, Yen Y, Stein J (2009) Identification of a Microsatellite marker associated with Stem rust resistance gene Sr35 in wheat. Australian Journal of crop science 34: 1835-1850
- Bindler G, Gunduz I, Plieske J, Ganal M, Rossi L, Gadani F, Donini P (2007) A Microsatellite marker based Linkage map of tobacco. Theoretical and applied Genetic Journal 114: 341-349
- Bindler G, Plieske J, Bakaher N, Gunduz I, Ivanov N, Donini P (2011) A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) obtained from Large scale microsatellite marker development.Theoretical and applied Genetic Journal 103: 157-185
- Brigneti G, Garcia J, Baulcombe DC (1998) Molecular mapping of the Potato Virus Y resistance gene (Ry sto) in potato. Tag Theoretical and applied Genetics 5:198-203
- Cernak I, Taller J, Wolf I, Feher E, Babinszky G, Polgar Z (2008) Analysis of the applicability of Molecular Markers Linked to PVY extreme resistance gene Ry sto, and the identification of new markers. Acta Biological Journal 10:195-203
- Czubacka A, Doroszewska T (2009) Obtaining tobacco double haploids containing different sources of resistance to PVY. Institute of Soil Science and plant cultivation.plant Breeding 121: 120-147
- Davalieva K, Maleva I, Filiposki K, Spiroski O, Efremov G (2010) Genetic variability of Macedonian Tobacco varieties determined by microsatellite marker analysis.diversity Journal 2: 439-449
- Fuentes JL, Correa-Victoria F, Prado F, Aricapa G, Duque G (2000) Simple Sequence Repeat (SSR) markers Linked to the blast resistance gene (pi-1)in rice for Marker-assisted Selection(MAS). diversity Journal 13: 130-138
- Gupton CL, Burk LG (1973) Location of the factor for resistance to potato virus Y in tobacco. The Journal of Heredity 26: 289-290
- Heldak J, Bezo M, Stefunova V, Gailikova A (2007) Selection of DNA markers for detection of extreme

شود، ولی در تحقیق کنونی، مشخص شد که فقط توتون رقم VAM دارای مقاومت کامل به بیماری PVY بوده و این مقاومت توسط دو ژن به نام های Va و Va2 کنترل می شود. از آنجایی که هنوز با استفاده از روش انتخاب به کمک نشانگر (MAS)، نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون، در داخل و خارج از کشور شناسایی نشده اند، در این پژوهش این کار با استفاده از نشانگر های SSR انجام گردید. در این پژوهش در آنالیز نهایی، ۳ نشانگر SSR پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون شناسایی شدند. این ۳ نشانگر SSR به نام های PT20165 بر روی کروموزوم ۷ توتون ،

resistance to Potato Virus Y(PVY) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum L.*) F1 progenies. Plant Breeding 43:125-134

Hu X, Meacham T, Ewing L (2009) A novel recombinant Strain of Potato Virus Y suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco.Virus Research 45(9): 68-76

Khajepoor MR (2004) Industrial plants. Publication of Isfahan Industrial university. (In Farsi)

Keiichi T, Akira U (2004) Anew Strain of Potato Virus Y isolated from burly tobacco in Japan. Diversity 21: 110-115

Korinsak S, Sriprakhon S, Sirithanya P, Jairina J, Vanarachit A (2009) Identification of Microsatellite Markers (SSR) Linked to a new bacterial blight resistance gene Xa33(t) in a rice cultivar (Ba 7). Genetic research 13:112-121

Li Y, Chen L, Lin F, Hassain K (2010) Identification of SSR markers Linked to resistance against the spotted stem Borer in Sorghum. Middle-East Journal of scientific research 6(5): 505-521

Mahtabi R (1999) Tobacco diseases. Publication of Tobacco products Company of Iran 2: 50-62. (In Farsi)

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of Molecular Markers Linked to disease-resistance genes by Bulk Segregated Analysis. Journal of Genetics 32: 982-990

Moon HS, Nifong JM, Nicholson JS, Heineman A, Lion K, Lewis RS (2009) Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) Genetic resources.Crop Science 49: 2149-2159

Najafi A, Mohammadi A, Torchi M, Moghaddam M (2009) Identification of Microsatellite markers Linked to resistance genes to Spike Fusarium disease in wheat, Agriculture knowledge magazine 12: 31-56. (In Farsi)

Naghavi MR, Ghareyazi B, Hosseyni Salekdeh GH (2005) Molecular markers. Publication of Tehran university 23(2):21-40. (In Farsi)

Piteekan T, Nanharat M, Denduangboripant J (2010) Genetic Plymorphism between tobacco cultivation-groups

revealed by AFLP marker analysis. *Journal of Agricultural Science* 5:110-118

Reynolds RJ (2011) The symptoms of Potato Virus Y(PVY) in Burly tobacco, *Phytopathology* 103:81-84

Rodol A, Xiong Zh (2008) Complementary functions of two R-genes determine resistance durability of tobacco Virgin A mutant(VAM) to Potato Virus Y. *Virology* 379: 275-290

Rossi L, Bindler G, Pijneb H, Gadani F (2000) Evaluation of Molecular marker thecnologies for tobacco Variety identification. *Plant and Animal Genome VIII Conference* 11: 51-55

Sabir J (2010) RAPD and Protein Markers for resistance to PVY in Potato Cultivars. *Journal of American Science* 6(9): 30-42

Shi A, Vierling R, Grazzini R (2011) Identification of Molecular markers for SW-5 gene of tomato spotted wilt

virus resistance. *American Journal Biotechnology and Molecular Sciences* 12: 120-127

Shou HD, Locas JB (1991) Tobacco disease. Center of universal publication of Tehran 9: 143-155. (In Farsi)

Tian YP, Liu JL, Zhang CL, Liu Y (2011) Genetic diversity of Potato Virus Y infecting tobacco Crops in china. *Phytopathology* 90: 2011-2019

Ying C, Wei S, Chao-Jie X, Xiu-Ling N (2006) Microsatellite Markers for A Yellow rust resistant gene in Wheat Cultivar guinong 21. *Plant Physiology* 110: 1857-1872

Yao ZH, Zhen Liu X, Sheng CH (2008) Genetic diversity among Flue-Cured tobacco Cultivars based on RAPD and AFLP Markers. *An international Biology Journal* 36: 1087-1101