بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۲/ سال ۱۴۰۲: ۱۱۵-۱۰۴ DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021789.444

CC BY

مقاله پژوهشی

ارزیابی ژنوتیپ‌های چغندرقند از نظر مقاومت به نماتد *Heterodera schachtii* در شرایط گلخانه و حضور نشانگر مولکولی MN3 *

کبری بختیاری[۱]، مژده کاکوئی نژاد[۲]، جواد رزمی[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۸ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۶)

چکیده

نماتد سیستی چغندر (*Heterodera schachtii*) به عنوان عامل محدودکننده کشت در مناطق چغندرکاری مطرح و نظر به اهمیت و گستردگی این بیماری در ایران، کاشت ارقام مقاوم از مؤثرترین راهکارهای کاهش خسارت آن است. از این رو، دستیابی به روش‌های دقیق و سریع ارزیابی مقاومت، امکان تهیه ارقام مقاوم را تسهیل می‌کند. در این پژوهش، واکنش ۲۰ ژنوتیپ داخلی و خارجی چغندرقند نسبت به نماتد سیستی در شرایط گلخانه و حضور نشانگر مولکولیMN3 که پیوسته با ژن مقاومت به این نماتد است مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از نظر مقاومت به نماتد سیستی در شرایط گلخانه، اختلاف معنی‌دار در سطح آماری پنج درصد وجود دارد. در رقم شماره F-21238 از نظر حضور نشانگر مولکولیMN3 و ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت به نماتد سیستی، فاقد بوته حساس بوده و از مقاومت بالائی نیز برخوردار بود. هیبریدهای شماره ۳۴۷۸۱ و ۳۴۷۹۱ در آزمایش گلخانه ای به ترتیب از بیشترین میزان بوته مقاوم (۸۰ و ۷۸ درصد) و در ارزیابی نشانگر MN3 نیز از مقاومت بالائی (۸۰ و ۸۹ درصد بوته مقاوم) به این بیمارگر برخوردار بودند. نتایج مبین آن است برای صرفه‌جویی در زمان و دقت بیشتر در انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم، مناسب است ابتدا حضور نشانگر مولکولی MN3 در ژنوتیپ‌ها مورد آزمون قرار گیرد و پس از آن ژنوتیپ‌های منتخب از نظر مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند در شرایط گلخانه بررسی شوند.

واژه های کلیدی: ارزیابی‌مقاومت، چغندرقند، نشانگر مولکولی، نماتد سیستی

---

*بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: J_razmi@yahoo.com

۱- گروه گیاهپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

CC BY

DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021789.444

Research Article
The assessment of sugar beet genotypes for resistance to *Heterodera schachtii* nematode under greenhouse conditions and the presence of MN3 molecular marker *

Kobra Bakhtiyari[1], Mozhdeh Kakueinezhad[2], Javad Razmi[1]**

(Received: 8.03.2024; Accepted: 15.06.2024)

Abstract

Heterodera schachtii, the sugar beet cyst nematode (BCN), is a limiting factor in most of the beet-growing regions of Iran. Considering this disease's importance and spread, generating resistant cultivars is one of the most important methods to reduce its damage. Achieving accurate and fast resistance assessment methods facilitates the development of resistant cultivars. This research aims to compare the response of twenty domestic and foreign sugar beet genotypes to BCN under greenhouse conditions and with the presence of the MN3 molecular marker, which is linked to the BCN resistance gene. Analysis of variance showed a significant difference among genotypes for resistance to BCN in greenhouse conditions. Using the MN3 molecular marker and greenhouse survey, no susceptible plants were observed in genotype No. F- 21238. Hybrids No. 34781 and 34791 demonstrated the highest resistance (80 and 78% of plants were resistant) under greenhouse conditions and good resistance (80 and 89% of plants were resistant) to this pathogen evaluating the MN3 marker. The results showed that to save time and more accuracy in selecting resistant genotypes, it is better to evaluate genotypes with MN3 molecular marker, and then the chosen genotypes are assessed to determine the level of resistance to this pathogen in greenhouse conditions.

Keywords: Cyst Nematode, Molecular marker, Resistance Assessment, Sugar beet

* A part of Msc. thesis of the first author submitted to Faculty of Agriculture and Food Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University

** Corresponding author, Email: J_razmi@yahoo.com
1 Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2 Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

مقدمه

نماتدهای سیستی از جمله مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی هستند که اهمیت اقتصادی زیادی در بسیاری از کشورهای جهان دارند. نماتد سیستی چغندر با نام علمی *Heterodera schachtii* Schmidt (1871) در همه مناطق عمده کشت چغندرقند در جهان پراکنده است و افزایش جمعیت آن منجر به کاهش شدید عملکرد تا ۶۰ درصد می شود (Wright *et al.* 2022). در آلودگی‌های بالا با ۲۰ تخم و لارو در یک سانتی متر مکعب خاک و شرایط معتدل آب و هوایی، میزان خسارت به محصول ارقام حساس ۳۰-۴۰٪ و ارقام مقاوم ۱۰-۲۰٪ گزارش شده است (Blok *et al.* 2018). در ایران این نماتد اولین‌بار در سال ۱۳۴۸ از مزارع چغندرقند استان خراسان گزارش شد (Esmailpour & Schäffer 1970) و هر ساله در مناطق متعدد کشت چغندرقند از جمله خراسان، آذربایجان غربی، اصفهان، کرمان و فارس موجب خسارت می‌شود (Mahmoudi 2013). در گیاهان آلوده به نماتد، ریشه اصلی کوتاه و ریشه‌های فرعی متعددی تشکیل و در اندام‌های هوایی موجب زردی، پژمردگی، کاهش و توقف رشد می‌شود (Owen *et al.* 2023). این نماتد تنوع ژنتیکی بالایی را در درون و در میان جمعیت‌های جغرافیایی نشان داده و این مسئله نیز مدیریت نماتد را پیچیده می‌کند، زیرا هر جمعیت ممکن است به اقدامات متناسبی نیاز داشته باشد که مطابق با ویژگی‌های خاص خود تنظیم شود (Nuaima *et al.* 2018, Nuaima *et al.* 2020). همچنین مدیریت نماتدها به علت عدم دسترسی به انواع نماتدکش‌ها مشکل است (Thurau *et al.* 2010) و به دلیل توانایی زنده‌مانی طولانی مدت نماتد سیستی در غیاب میزبان (تا ۲۰ سال) در خاک (Grainger 1964)، مدیریت این نماتد با تناوب زراعی دشوار و ریشه‌کنی پس از وقوع آلودگی تقریبا غیرممکن است (Jones *et al.* 2013). به همین سبب، بهره‌گیری از ارقام مقاوم چغندرقند یک روش موثر در مدیریت این بیمارگر به شمار آمده (Jung *et al.* 1998) و کاشت این ارقام برای کنترل نماتد ضروری بوده (Müller 1999) و موجب کاهش مصرف نماتدکش‌ها، کاهش آلودگی محیط‌زیست و هزینه‌های تولید می‌شود (Kim & Yang 2019, Saadony *et al.* 2021).

با این حال، ارزیابی ژنتیکی ژرم‌پلاسمهای چغندرقند و مواد اصلاحی آن نشان داده که در زیرگونه *Beta vulgaris* sub sp. *vulgaris*، منابع مقاومت به نماتد سیستی وجود ندارد (Doney & Whitney 1969, Heijbroek 2002). در گونه‌های وحشی چغندر، حداقل سه ژن مقاومت به نماتد شناسایی شده که ژن *Hs1* در کروموزوم شماره یک هر سه گونه بخش Procumbentes (Cooke & Scott 1993) شامل گونه‌های *Beta procumbens*، *Beta webbiana* و *Beta patellaris*، ژن *Hs2* در کروموزوم شماره هفت گونه *B. procumbens* و *B. webbiana* و ژن *Hs3* در کروموزوم شماره هشت گونه *B. webbiana* قرار گرفته است (Thurau *et al.* 2010). کای و همکاران (Cai *et al.* 1997) موفق به جداسازی اولین ژن مقاومت به نماتد موسوم به ژن $Hs1^{pro-1}$ با منشاء گونه *Patellifolia procumbens* شدند که مقاومت تک‌ژنی و غالب را ایجاد کرده و در دهه‌های قبل بیش از ژن‌های دیگر جهت انتقال به ارقام چغندرقند مورد استفاده قرار گرفته است. از تلاقی بین گونه‌ای میان چغندرقند و چغندروحشی گونه *P. procumbens*، منابع مقاوم به نماتد سیستی حامل ژن $Hs1^{pro-1}$ بدست آمد. با این حال انتقال این ژن به چغندرقند موجب انتقال صفات نامطلوبی از منشاء *P. procumbens* از جمله گال ریشه و کاهش عملکرد می‌شد. سپس یک منبع ژنتیکی موثر مقاومت به نماتد سیستی در چغندر دریایی (*B. vulgaris* subspecies *maritima* (L.) Arcang.) موسوم به *WB242* یافت شد

(Biancardi *et al*. 2012). استوناتو و همکاران (Stevanato *et al*. 2015) یک نشانگر SNP با وراثت تک‌ژنی و غالب پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی از منشاء *B. maritima* موسوم به *HsBvm-1* را شناسایی کردند. سدره‌نشین و همکاران در سال ۱۳۹۳ نیز یک نشانگر مولکولی STS پیوسته با این ژن را شناسایی کردند که می‌تواند بوته‌های هموزیگوت را از هتروزیگوت شناسایی کند (Sadrehneshin *et al*. 2014). سپس بر اساس توالی نشانگر مذکور، اقدام به طراحی آغازگر هم بارز جدیدی موسوم به MN3 شد (Norouzi *et al*. 2017, Norouzi *et al*. 2022). سیلمن و همکاران (Sielemann *et al*. 2023) نیز در تحقیقات خود ژن NLP7 را شناسایی کردند که با مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند ارتباط دارد.

امروزه، چندین رقم مقاوم به نماتد به صورت تجاری در دسترس هستند که مقاومت آنها از *B. vulgaris* subspecies *maritima* منشاء می گیرد. البته کارایی مقاومت در برابر نماتد سیستی چغندرقند به شدت به فشار آلودگی بستگی دارد (Thurau *et al*. 2010) و در صورت تراکم بالای جمعیت نماتد و شرایط آب و هوایی مساعد مقاومت کاهش می‌یابد (Daub & Westphal 2012, Niere 2009). از این رو، هر ساله مراکز تحقیقاتی و شرکت‌های تولیدکننده بذر، ارقام جدید با سطوح مقاومت بالاتر معرفی می‌کنند. حال با توجه به اهمیت و گستردگی پراکنش نماتد سیستی در مناطق چغندرکاری کشور و با هدف تامین امنیت غذایی و جلوگیری از خروج ارز از کشور و نیز هزینه بالای تامین بذور خارجی، اصلاح و معرفی هیبریدهای داخلی مقاوم به نماتد سیستی یک ضرورت جدی است. تاکنون چند رقم مقاوم چغندرقند به نماتد سیستی در کشور معرفی شده است (Seed and Plant Certification and Registration Institute 2024). با این حال با توجه به گسترش مزارع آلوده به نماتد در کشور و مقاومت نسبی این ارقام، بایستی هیبریدهایی با مقاومت بیشتر تهیه و معرفی شوند که در شرایط آلودگی وسیع، خسارت کمتری در محصول ایجاد شود. لذا هدف از انجام این پژوهش، بررسی واکنش ژنوتیپ‌های چغندرقند از نظر تعداد سیست کمتر روی ریشه در شرایط گلخانه و مقایسه آن با نتایج نشانگر مولکولی MN3 پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند و نحوه به کارگیری این نشانگر در غربال ژنوتیپی مواد اصلاحی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند بود.

مواد و روش‌های بررسی

مواد گیاهی

تیمارهای آزمایش شامل ۱۳ هیبرید جدید داخلی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند (شماره‌های 34759، 34761، 34763، 34775، 34776، 34779، 34780، 34781، 34787، 34789، 34791، 34793 و SBSI-138) و سه رقم جدید خارجی (F-21237، F-21238 و F-21244) به همراه یک شاهد حساس (رقم شریف)، یک شاهد مقاوم داخلی (SBSI-1) و دو شاهد مقاوم خارجی (F-20732 و F-20746) بود.

ارزیابی گلخانه‌ای

بذر ژنوتیپ‌های چغندرقند در لیوان‌های یکبارمصرف به حجم ۲۰۰ سانتی‌متر مکعب حاوی خاک استریل کاشته شد و در داخل جعبه‌های بزرگ پلاستیکی که شرایط دمای گلخانه ۱±۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شده بود قرار داده شد. برای هر ژنوتیپ، ۱۰ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد. برای ارزیابی ارقام در شرایط گلخانه از روش مولر (Mùller 1998) استفاده شد. برای تهیه لارو *Heterodera schachtii*، مقداری خاک از مزرعه دارای سابقه آلودگی به نماتد سیستی چغندرقند در مرکز تحقیقات

کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. به منظور جداسازی سیست از خاک، دویست گرم خاک آلوده به نماتد در داخل تشت پلاستیکی ریخته شد و پنج برابر حجم خاک، آب اضافه و کاملاً مخلوط گردید. سپس سیست‌ها با روش وان بزواین (Van Bezooijen 2006) استخراج شدند. سیست‌های استخراج‌شده در داخل سبدهای پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتیمتر پوشانده شده با پارچه تنظیف، درون ظروف پلاستیکی محتوی محلول سه میلی مولار کلریدروی ($ZnCl_2$) قرار داده شدند. پس از گذشت سه روز، لاروهای تفریخ شده توسط الک ۳۷ میکرومتری جدا و شمارش شدند. تعداد ۱۰۰۰ عدد لارو سن دوم زنده و فعال توسط سرنگ مخصوص به هر گلدان حاوی گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های چغندرقند مورد آزمون در مرحله چهار تا شش برگی مایه‌زنی شدند (Müller 1998).

محاسبه میزان آلودگی به نماتد و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها

شش هفته پس از مایه‌زنی، ریشه ها از خاک خارج و تعداد سیست‌های تشکیل‌شده روی هر بوته شمارش شد و مبنای مقایسه ژنوتیپ‌ها در واکنش به نماتد سیستی چغندرقند قرار گرفت (Müller 1998). مطابق روش اشمیت و شانون (Schmitt & Shannon 1992)، مقادیر شاخص ماده(Female Index, FI) بر اساس رابطه زیر در مورد هر یک از ژنوتیپ‌ها محاسبه شد. شاخص ماده هر ژنوتیپ، با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت.

100 ×(میانگین تعداد سیست تشکیل شده روی ریشه شاهد حساس)/(میانگین تعداد سیست تشکیل شده روی ریشه ژنوتیپ) = شاخص ماده

بررسی نشانگر MN3 در ژنوتیپ‌ها

همه بوته‌های کشت شده در گلخانه به صورت تک بوته شماره‌گذاری و نمونه برگ جداسازی و به آزمایشگاه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند منتقل و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از برگ با روش نوروزی (Norouzi 2004) تغییر یافته انجام شد. به طوری که بجای کلروفرم ایزوآمیل الکل از استات پتاسیم پنج مولار و بجای ایزوپروپانل از اتانل ۹۶ درصد استفاده شد.

آزمون PCR

واکنش زنجیره ای پلیمراز، با جفت آغازگر نشانگر MN3 (Norouzi *et al* 2017, Norouzi *et al* 2022) روی DNA تک بوته‌های هر ژنوتیپ بدین شرح انجام شد؛ حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای هر واکنش شامل یک میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۵۰ng/µl، دو میکرولیتر بافر 10X، دو میکرولیتر dNTP ۲/۵ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای اختصاصی نشانگر مربوطه با غلظت ۵ میکرومولار و ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) آنزیم Taq پلی‌مراز بود. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، در دستگاه ترمال‌سایکلر شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ °C سپس ۳۵ چرخه، هر چرخه شامل سه مرحله واسرشت سازی به مدت ۲۵ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۳۵ چرخه مرحله اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ °C و توسعه آغازگر به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و سپس یک مرحله ۱۰ دقیقه ای توسعه نهایی در دمای ۷۲ °C برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش انجام شد. سپس الکتروفورز محصولات واکنش PCR در ژل آگارز حاوی رنگ اختصاصی Safe View (شرکت Abm کلنادا) و مشاهده نوارهای نشانگر MN3 با دستگاه مستندسازی ژل انجام شد. در این نشانگر، اندازه باندهای نشانگر جفت و ناجفت به ترتیب ۸۰۷ و ۵۴۷ نوکلئوتید

است. سپس بر اساس الگوی نواربندی ژنوتیپ‌ها روی ژل، ژنوتیپ هر یک از بوته‌ها از نظر مقاومت به نماتد سیستی ارزیابی شدند (Norouzi *et al.* 2017, Norouzi *et al.* 2022).

مقایسه حضور نشانگر MN3 با ارزیابی گلخانه‌ای

با نشانگر MN3 ژنوتیپ‌ها در دو گروه حساس دارای باند ۵۴۷ جفت بازی و مقاوم (شامل هموزیگوت دارای باند ۸۰۷ جفت بازی و هتروزیگوت دارای باندهای ۸۰۷ و ۵۴۷ جفت بازی) تفکیک می‌شوند. برای تفکیک دو گروه حساس و مقاوم در شرایط گلخانه نیز از روش اشمیت و شانون (Schmitt & Shannon 1992) استفاده شد و ژنوتیپ‌های دارای FI<31 به عنوان مقاوم و ژنوتیپ‌های دارای FI≥31 به عنوان حساس تفکیک شدند. سپس تک‌بوته‌های هر ژنوتیپ در آزمون مولکولی و گلخانه‌ای بر اساس اینکه در گروه حساس یا مقاوم قرار گرفته بودند نمره‌دهی شدند. همچنین خطای نوع اول (درصد بوته‌هایی که نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند درآنها ردیابی می‌شود، ولی در آزمایش ارزیابی گلخانه‌ای حساسیت نشان می‌دهند) و خطای نوع دوم (درصد بوته‌هایی که حضور نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند در آنها ردیابی نشده، ولی در ارزیابی گلخانه‌ای تعداد سیست کمی روی ریشه داشتند) در هر ژنوتیپ محاسبه شد (Norouzi *et al.* 2017, Norouzi *et al.* 2022).

نتیجه

ارزیابی مقاومت به نماتد سیستی در شرایط گلخانه

نتایج تجزیه واریانس شاخص ماده، هر یک از ژنوتیپ‌ها نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها در سطح آماری پنج درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱). این نتایج، مبین وجود تنوع در تعداد سیست تشکیل شده روی ریشه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی این مطالعه است. بر این اساس ژنوتیپ‌های شماره F-21238، 34791، F-20732 و F-20746 به ترتیب با شاخص ماده ۱۶/۷، ۲۲، ۲۲/۲ و ۲۳ بیشترین میزان مقاومت به نماتد سیستی را داشتند(جدول ۲). ژنوتیپ‌های 34759، 34780، 34775، SBSI-138 و شاهد حساس (رقم شریف) به ترتیب با شاخص ماده ۳۷/۵، ۴۲/۸، ۴۴/۷، ۶۱/۷ و ۱۰۰ کمترین میزان مقاومت به نماتد سیستی را داشتند (جدول ۲).

نشانگر مولکولی هم بارز MN3

الگوی باندی نشانگر هم بارز MN3 در تک بوته‌های هر یک از هیبریدها و ارقام چغندرقند به دست آمد (شکل شماره ۱). همان گونه که در شکل یک نشان داده می شود، بوته‌های هموزیگوت مقاوم چاهک‌های شماره ۴، ۱۲، ۱۳، ۱۷ و ۲۱ دارای تک باند ۸۰۷ جفت بازی، بوته های هتروزیگوت مقاوم چاهک‌های شماره ۲، ۳، ۵، ۷ تا ۱۱، ۱۵و ۱۹ دارای دو باند ۸۰۷ و ۵۴۷ جفت بازی و بوته های حساس چاهک‌های شماره ۶، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ دارای تک باند ۵۴۷ جفت بازی بودند.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های چغندرقند نسبت به نماتد سیستی چغندرقند در شرایط گلخانه

Table 1- The results of variance analysis of sugar beet genotypes resistance assessment to sugar beet cyst nematode in greenhouse conditions

Mean squares	Degrees of freedom	Sources of variation
1005.2**	18	Genotypes
245.5	171	Error

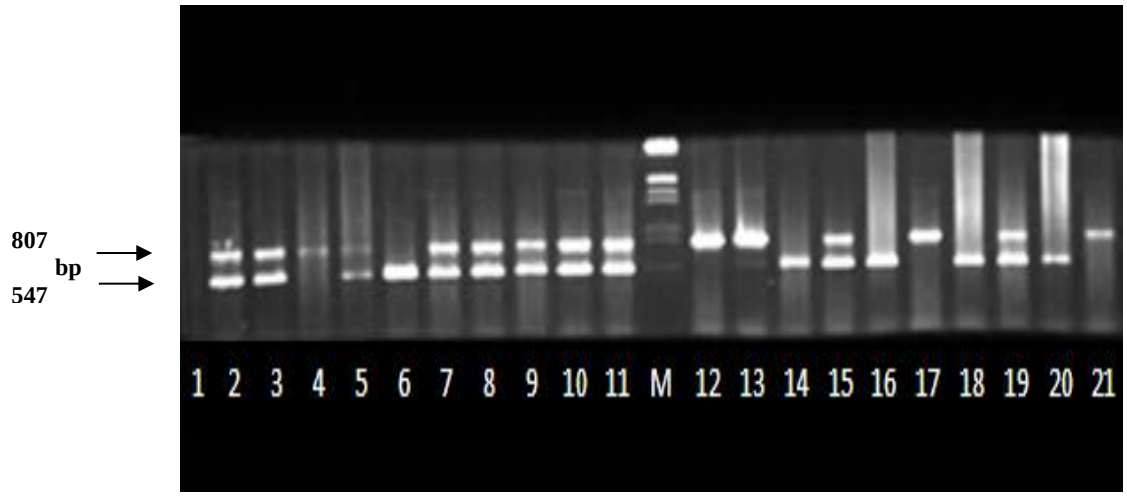
**: significant at 5% of probability

** معنی دار درسطح احتمال ۵٪

جدول ۲- ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های چغندرقند در برابر نماتد سیستی در شرایط گلخانه در سطح احتمال پنج درصد

Table 2- results of resistance screening of sugar beet genotypes against cyst nematode in greenhouse conditions at the probability level of 5%

Female Index	Genotype
16.7	F – 21238
22.0	34791
22.2	F – 20732
23.0	F – 20746
25.6	34781
27.4	F – 21244
28.4	34779
28.5	F – 21237
29.3	34787
30.7	34761
32.5	34776
33.0	34763
33.4	SBSI – 1
33.4	34793
34.8	34789
37.5	34759
42.8	34780
44.7	34775
61.7	SBSI-138
13.8	LSD 5%
100.0	Susceptible control (Sharif)



شکل۱- الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر مولکولی **MN3** پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی در هیبریدها و ارقام چغندرقند. چاهک ۱ کنترل منفی (**master mix** بدون **DNA**)، چاهک‌های ۶، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ مربوط به تک‌بوته‌های هموزیگوت حساس، چاهک‌های ۴، ۱۲، ۱۳، ۱۷ و ۲۱ مربوط به تک‌بوته‌های هموزیگوت مقاوم و چاهک‌های ۲، ۳، ۵، ۷ تا ۱۱، ۱۵ و ۱۹ مربوط به تک‌بوته‌های هتروزیگوت مقاوم است. **M**: نشانگر تعیین اندازه **DNA** (**Lambda DNA /*Eco*RI+*Hin*dIII Marker**)

Figure 1- The electrophoresis pattern of MN3 molecular marker linked to cyst nematode resistance gene in sugar beet hybrids and cultivars lane.1 negative control master mix without DNA, lane 6, 14, 16, 18 and 20 correspond to susceptible homozygous single plants, lane 4, 12, 13, 17 and 21 correspond to resistant homozygous single plants and lane 2, 3, 5, 7 to 11, 15 and 19 are related to single resistant heterozygous plants. M: DNA size marker (Lambda DNA/*EcoRI+Hind*III Marker)

درصد توافق بین حضور نشانگر MN3 و میزان مقاومت در ارزیابی گلخانه‌ای در هر یک از هیبریدها و ارقام چغندرقند محاسبه شد که نتایج آن در جدول شماره ۳ آورده شده است.

بیشترین میزان خطای نوع اول در هیبرید 34775 به میزان ۸۰ درصد و کمترین آن در هیبرید SBSI-138 و رقم خارجی F-21238 و شاهد حساس به میزان صفر درصد بدست آمد. خطای نوع دوم در سایر هیبریدها و ارقام در محدوده صفر تا ده درصد قرار داشت. کمترین درصد توافق در هیبرید شماره 34775 و بیشترین میزان توافق نیز در ارقام F-21238 و شاهد حساس بدست آمد (جدول ۳).

جدول ۳ – مقایسه نتایج نشانگر مولکولی MN3 و آزمایشات ارزیابی مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند در شرایط گلخانه

Table 3 - Comparison of the results of the MN3 molecular marker and resistance evaluation tests to the beet cyst nematode in greenhouse conditions

Overall agreement percentage of the presence of MN3 marker with greenhouse resistance	Error Type 2 **	Error Type 1*	Genotype
50	10	40	34759
50	0	50	34761
60	0	40	34763
20	0	80	34775
70	0	30	34776
60	0	40	34779
40	0	60	34780
80	10	10	34781
56	0	44	34787
90	0	10	34789
67	11	22	34791
70	0	30	34793
90	10	0	SBSI 138
60	10	30	SBSI – 1
70	10	20	F – 20732
90	0	10	F – 20746
80	0	20	F – 21237
100	0	0	F – 21238
90	0	10	F – 21244
100	0	0	Sharif (Susceptible Control)

*خطای نوع اول: درصد بوته‌هایی که حضور نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند در آنها ردیابی شد، ولی در ارزیابی گلخانه‌ای حساسیت بالایی داشتند.

**خطای نوع دوم: درصد بوته‌هایی که حضور نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند در آنها ردیابی نشد، ولی در ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت داشتند.

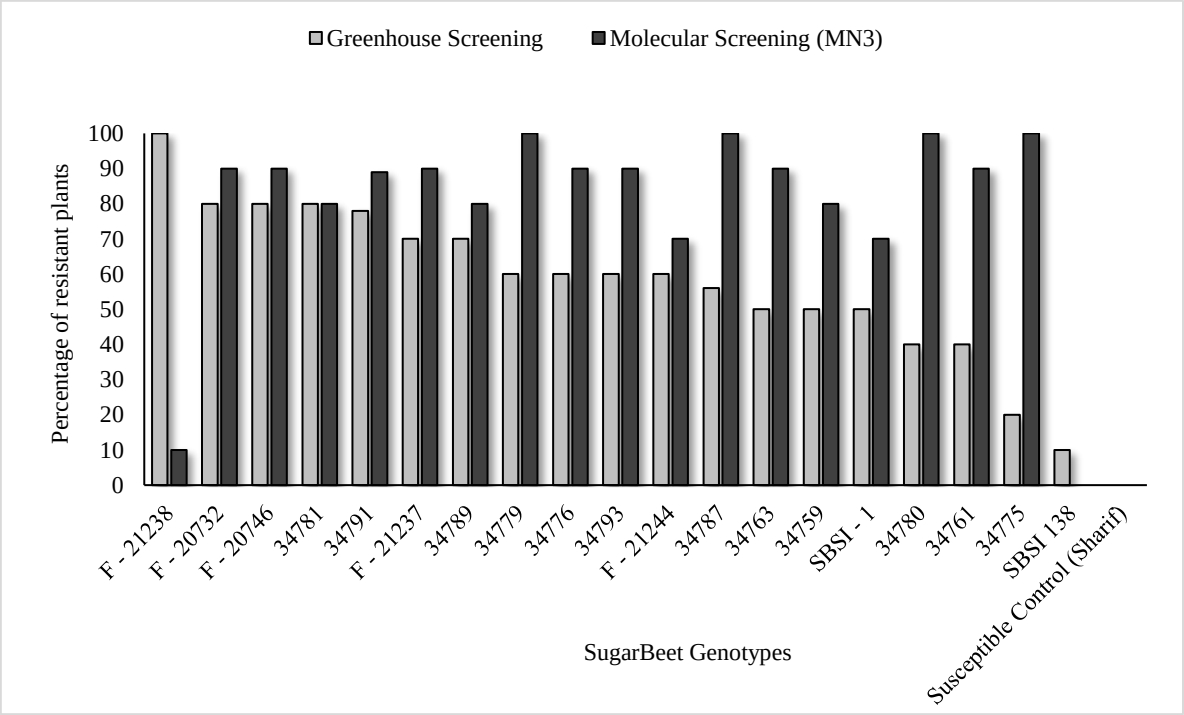
* Error type 1: the percentage of plants in which the presence of a linked marker with the sugar beet cyst nematode resistant gene was detected, but they were susceptible in the evaluation in greenhouse conditions.

** Error type 2: the percentage of plants in which the presence of a linked marker with the sugar beet cyst nematode resistance gene was not detected, but they were resistant in the evaluation in greenhouse conditions.

درصد بوته مقاوم هر یک از ارقام و هیبریدهای چغندرقند در آزمایش گلخانه‌ای و آزمایش نشانگر MN3 نیز در شکل شماره ۲ آورده شده است. میانگین درصد بوته مقاوم در شاهد حساس در هر دو روش صفر درصد بود. در هیبریدهای 34779، 34787، 34780 و 34775 که در ارزیابی با نشانگر MN3 در همه بوته‌های آنها نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند ردیابی شد، در آزمایش ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت به نماتد سیستی

به ترتیب ۶۰، ۵۶، ۴۰ و ۲۰ درصد بوته مقاوم به نماتد وجود داشت. در ژنوتیپ شماره F-21238 در هیچ یک از آزمایشات گلخانه‌ای و نشانگر مولکولی بوته حساس وجود نداشت و از مقاومت بالائی نسبت به نماتد سیستی چغندرقند برخوردار بود (شکل ۲).

هیبریدهای شماره 34781 و 34791 در آزمایش گلخانه‌ای به ترتیب از بیشترین میزان بوته مقاوم (۸۰ و ۷۸ درصد) و در ارزیابی نشانگر MN3 نیز از مقاومت بالائی (۸۰ و ۸۹ درصد بوته مقاوم) به این بیمارگر برخوردار بودند (شکل۲).



شکل ۲- درصد بوته مقاوم در هر یک از ژنوتیپ‌های چغندرقند در ارزیابی گلخانه‌ای و آزمون مولکولی MN3

Figure 2- Percentage of resistant plants in each sugar beet genotypes under greenhouse conditions and based on presence of MN3 molecular analysis

بحث

یکی از مهمترین راهکارهای کنترل خسارت در مزارع آلوده به نماتد سیستی، استفاده از ارقام چغندرقند با مقاومت بالا و پایدار است. با توجه به اینکه نتیجه برهمکنش گیاه–نماتد بسته به رقم می‌تواند بسیار متفاوت باشد، انتخاب رقم مناسب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Heijbroek *et al*. 2002, Kakaire *et al*. 2015). دستیابی به روش‌های سریع و دقیق برای یافتن منابع ژنتیکی مقاوم به نماتد سیستی ضروری است. در تحقیق حاضر دو روش ارزیابی مقاومت به نماتد سیستی در شرایط گلخانه و ارزیابی مقاومت با آزمون نشانگر مولکولی MN3 پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی از منبع *B. vulgaris* subspecies *maritima* در تعدادی از هیبریدها و ارقام چغندرقند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش فنوتیپی نشان داد که از نظر مقاومت به نماتد سیستی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی تنوع مطلوبی وجود داشت.

دائوب (Daub 2021) نیز گزارش کرد که ارقام چغندرقند در مقاومت نسبی به نماتد سیستی چغندرقند تنوع نشان دادند. آلودگی بالایی در همه تک بوته‌های شاهد حساس (رقم شریف) مشاهده شد که با یافته های وستفال (Westphal 2013) مطابقت دارد. وی گزارش کرد که ارقام حساس، تعداد سیست قابل‌توجه بالاتری نسبت به واریته‌های مقاوم تولید می‌کنند. بر این اساس ژنوتیپ‌های شماره F-21238، 34791، F-20732 و F-20746 بیشترین میزان مقاومت به نماتد سیستی را داشتند. ژنوتیپ‌های 34759، 34780، 34775، SBSI-138 و شاهد حساس (رقم شریف) کمترین میزان مقاومت به نماتد سیستی را داشتند. مطابق نتایج این تحقیق لیولن و پاکیش (Lewellen & Pakish 2005) نیز در مطالعات خود گزارش نمودند که برخی از هیبریدهای تجاری از منبع *B. vulgaris* subspecies *maritima* ، اثر معنی داری بر کاهش تعداد سیست دارند.

نتایج ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های چغندرقند به نماتد سیستی با استفاده از نشانگر MN3 نشان داد که میزان خطای نوع اول این نشانگر در محدوده صفر تا ۸۰ درصد در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند متغیر بود. این مطلب نشان از آن دارد که در برخی از ژنوتیپ‌ها که نشانگر MN3، آنها را مقاوم به نماتد سیستی شناسائی کرده بود از صفر تا ۸۰ درصد از بوته‌های آن ژنوتیپ‌ها در آزمایش گلخانه‌ای واکنش حساسیت به نماتد سیستی چغندرقند نشان دادند. عواملی از جمله فاصله نوترکیبی نشانگر با ژن مقاومت به نماتد سیستی و یا چندژنی بودن مکانیسم مقاومت و یا فشار مایه تلقیح می‌تولند باعث خطای نوع اول شود (Norouzi *et al*. 2022). خطای نوع دوم این نشانگر در محدوده صفر تا ۱۰ درصد در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند متغیر بود که این مطلب نیز نشان‌دهنده این است که در برخی از ژنوتیپ‌های چغندرقند حداکثر ۱۰ درصد بوته‌هایی که حضور نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند در آنها ردیابی نشد، در ارزیابی مقاومت گلخانه‌ای مقاوم بودند. عواملی از جمله فرار گیاهان از آلودگی در ارزیابی گلخانه‌ای و یا وجود سایر ژن‌های مقاومت به نماتد سیستی در چغندرقند می تواند باعث خطای نوع دوم شود(Norouzi *et al*. 2022). بر اساس نتایج آزمایشات نوروزی و همکاران بین ارزیابی فنوتیپی مقاومت در شرایط گلخانه وحضور نشانگر MN1 و MN2 به ترتیب توافق کلی ۷۰ و ۶۸ درصد گزارش شده است (Norouzi *et al*. 2022). این نشانگرها هم از نشانگر STS پیوسته با ژن مقاومت سیستی چغندرقند از منابع بتا ماریتیما به دست آمده اند (Sadrehneshin *et al*. 2014). تفاوت نشانگر MN3 به کار رفته در تحقیق حاضر با دو نشانگر مذکور این است که طراحی آغازگرهای مستقیم و معکوس برای نشانگر MN3 به گونه ای بوده است که طول محصول PCR باندهای آلل مقاوم و حساس کوچکتری داشته و باعث کاهش زمان PCR و تفکیک بهتر دو بلند مقاوم و حساس در الکتروفورز محصولات PCR شده است. در تحقیقات اخیر نوروزی (داده های منتشر نشده) ارتباط نشانگر MN3 با مقاومت به نماتد سیستی در شرایط گلخلنه و مزرعه در هزاران بوته مورد ارزیابی قرار گرفته و توافق کلی بین ژنوتیپ نشانگر با فنوتیپ مقاومت/ حساسیت حدود ۷۰ درصد و خطای نوع اول حدود ۲۰ درصد بدست آمده است و در چند سال اخیر به طور معمول از این نشانگر در غربال اولیه لاین های اصلاحی و تعیین درصد حضور ژن مقاومت به نماتد سیستی در هیبریدها و ارقام تجارتی چغندرقند بهره برداری شده است.

بنابراین نتایج این مطالعه مبین آن است که برای صرفه‌جویی در زمان و انتخاب دقیق‌تر ژنوتیپ‌های مقاوم، بهتر است ابتدا نشانگر مولکولی MN3 در غربال‌های اولیه ارزیابی مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند مورد استفاده قرار گیرد و پس از آن ژنوتیپ‌های منتخب دارای ژن

مقاومت به نماتد سیستی، از نظر فنوتیپی برای تعیین تعداد سیست تشکیل شده روی ریشه در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گیرند. با این وجود شناسائی نشانگرهای مولکولی جدید برای بررسی تعداد بیشتر ژن‌های مقاومت در ژنوتیپ‌های چغندرقند می‌تواند موجب افزایش دقت در انتخاب منابع مقاومت به این بیمارگر شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند به دلیل در اختیار قرار دادن بذور ژنوتیپ‌های چغندرقند، نشانگر مولکولی و فراهم آوردن امکانات اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

References **منابع**

Biancardi E .Panella L.W. and Lewellen R. T. 2012. *Beta maritima*: the origin of beets. Springer Science & Business Media. USA. 292 p .10.1093/aob/mcu092

Blok V. C., Tylka G. L., Smiley R. W., de Jong W. S. and Daub M. 2018. Resistance breeding, pp. 174-214. In: R. N. Perry, M. Moens and J. T. Jones (Eds). Cyst Nematodes. CABI, Wallingford, UK

Cai D., Kleine M., Kifle S., Harloff H. J., Sandal N. N., Marcker K. A., Klein-Lankhorst R. M., Salentijn E. M., Lange W., Stiekema W. J., Wyss U., Grundler F. M and Jung C. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science 275:832–834. 10.1126/science.275.5301.832

Cooke D. A. and Scott R. K. 1993. The Sugar Beet Crop: Science into Practice. London: Chapman and Hall. 675 pp.

Daub M. and Westphal A. 2012. Integrated nematode management at crop rotation systems with sugar beets. Sugar Industry 137, 110-119. 10.36961/si12585

Daub M .2021 .The beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*): an ancient threat to sugar beet crops in Central Europe has become an invisible actor. In: Sikora RA, Desaeger J, Molendijk L (eds) Integrated nematode management: state-of-the-art and visions for the future. CABI, Wallingford, pp 394–399.

Doney D. L., Whitney E .D., 1969. Screening sugar beet for resistance to *Heterodera schachtii*. Journal of American Society of Sugar Beet Technologists. 15: 546-552.

Esmailpour M. H., Schäffer R. 1970. Sugar beet nematode *Heterodera schachtii* in Iran. Entomologie et Phytopathologie Appliquées.; 29: 7-10. (In Persian)

Grainger J. 1964. Factors affecting the control of eelworm diseases. Nematologica, 10, 5–20. DOI: 10.1163/187529264X00574

Heijbroek W., Munning R.G. and van Swaaij ACPM. 2002. The effect of different levels of beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii*) and beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) on single and double resistant sugar beet cultivars. European Journal of Plant Pathology 108, 735-744. 10.1023/A:1020874511047

Jones J.T., Haegeman A. Danchin E. G., Gaur H.S., Helder J., Jones M. G., Kikuchi T., Manzanilla-Lopez R., Palomares-Rius J. E., Wesemael W. M and Perry R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14:946–961. 10.1111/mpp.12057

Jung C., Cai D. and Kleine M. 1998. Engineering nematode resistance in crop species. Trends in Plant Science 3:266–271. 10.1016/S1360-1385(98)01247-3

Kakaire S., Grove I.G. and Haydock P.P.J. 2015. The number of generations of *Heterodera schachtii* completed on oilseed rape (*Brassica napus* L.) during the UK growing season. Nematology 17, 557-565. 10.1163/15685411-00002889

Kim Y.H., and Yang J.W. 2019. Recent research on enhanced resistance to parasitic nematodes in sweet potato. Plant Biotechnology Reports, 13, 559–566. 10.1007/s11816-019-00557-w

Lewellen, R.T., Pakish, L.M. 2005. Performance of sugar beet cyst nematode resistant cultivars and a search for sources of resistance. American Society of Sugar beet Technologists, March 2-5, 2005, Palm Springs, California. p. 122-123.

Mahmoudi S.B. 2013. Sugar beet diseases. In: Formation of potential determination standards and damage

assessment by separation of management and coercive factors in different stages of growth in sugar beet fields. Sugar Beet Seed Institute, Karaj. Iran.; pp. 177-210. (in Persian).

Müller J. 1998. New pathotypes of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) differentiated on alien genes for resistance in beet (*Beta vulgaris*). Fundamental and Applied Nematology 21:519–526.

Müller. J. 1999. The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. Helminthologia, 36, 205–213.

Niere B. 2009. Principles of beet cyst nematode management. Sugar Industry 134, 186-192.

Norouzi P., Stevanato P., Mahmoudi S. B., Fasahat P. and Biancardi E. 2017. Molecular progress in sugar beet breeding for resistance to biotic stresses in sub-arid conditions-current status and perspectives. Journal of Crop Science and Biotechnology. 20. 99-105. 10.1007/s12892-016-0090-0

Norouzi P .2004. Simple and effective method for genomic DNA extraction from plant and fungus for PCR-based analyses . Journal of Sugar Beet 19: 175-177. (in Persian). 10.22092/JSB.2004.8212.

Norouzi P., Rajabi A. and Fasahat P. 2022. Molecular markers in sugar beet. Publication of agricultural education. Iran. 275 p.

Nuaima, R. H., Roeb J., Hallmann J., Daub M. and Heuer, H. 2020. Significant genetic differences among *Heterodera schachtii* populations within and among sugar beet production areas. Nematology 22: 165–177. 10.1163/15685411-00003297

Nuaima R.H., Roeb J., Hallmann J., Daub M., Otte S., Heuer H. 2018. Effector gene vap1 based DGGE fingerprinting to assess variation within and among *Heterodera schachtii* populations. Journal of Nematology: 50, 517–528. 10.21307/jofnem-2018-055

Owen, K., Walia, R. K., Yan, G., & Khan, M. R. 2023. Nematode problems in wheat and barley and their sustainable management. pp. 97-131. In: Khan, M. R., & Quintanilla, M. (Eds.). Nematode diseases of crops and their sustainable management. Academic Press. USA. 10.1016/B978-0-323-91226-6.00026-2

Saadony M. T., Abuljadayel D.A., Shafi M. E., Albaqami N. M., Desoky E. S. M., and El-Tahan. A. M. 2021. Control of foliar phytoparasitic nematodes through sustainable natural materials: Current progress and challenges. Saudi Journal of Biological Sciences, 28, 7314–7326. 10.1016/j.sjbs.2021.08.035.

Sadrehneshin SF, Mirzaei Asl A, Mahmoudi SB, Khodaei L. 2014. Molecular marker linked to beet cyst resistance gene (genes) originated from *Beta maritima* in sugar beet. 2nd National Conference on Applied Researches in Agriculture Sciences. Tehran University. (In Persian)

Schmidt A. 1871. Uber den Ruben-Nematoden (*Heterodera schachtii* A.S.). Zeitschrift Des Vereines Fur Die Rubenzucker-Industrie Im Zollverein, 21:1-19.

Schmitt D. P. and Shannon G. 1992. Differentiating soybean responses to *Heterodera glycines* races. Crop Science 32(1): 275-277. 10.2135/cropsci1992.0011183X003200010056x

Seed and Plant Certification and Registration Institute. 2024. Sugar beet varieties. https://spcri.ir/page-Main/fa/0/form/pId477.

Sielemann K., Pucker. B. and Orsini. E. et al. 2023. Genomic characterization of a nematode tolerance locus in sugar beet. BMC Genomics 24, 748. 10.1186/s12864-023-09823-2

Stevanato P., Trebbi D., Panella L., Richardson K., Broccanello C. and Pakish L. et al. 2015. Identification and validation of a SNP marker linked to the genehsbvm-1 for nematode resistance in sugar beet. Plant Molecular Biology Reporter. 33:474-479. 10.1007/s11105-014-0763-8

Thurau T., Ye W., Menkhaus J., Knecht K., Tang G and Cai D. 2010. Plant nematode control. Sugar Tech 12:229–237. 10.1007/s12355-010-0056-y

Van Bezooijen J. 2006. Methods and techniques for nematology. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University. p.20.

Westphal A. 2013. Vertical distribution of *Heterodera schachtii* under susceptible, resistant, or tolerant sugar Beet cultivars. Plant Dis 97: 101–106. 10.1094/PDIS-05-12-0476-RE

Wright A. J., Stevens M., Back M. A., and Sparkes D. L. 2022. A new method to validate and compare varietal resistance and yield tolerance of sugar beet (Beta vulgaris) against the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii* Schmidt. Pest Management Science, 78(7), 2767-2778. 10.1002/ps.6885