مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۳، شماره ۱، سال ۱۳۹۶

# گزینش لاین‌های اوتایپ چغندرقند مقاوم به بیماری ریزومانیا

# Selection of Sugar Beet O-Type Lines Resistant to Rhizomania Disease

سعید واحدی[۱]، محمدرضا اوراضی زاده[۲]، محسن آقائی‌زاده[۳]، پیمان نوروزی[۴] و محسن بذرافشان[۵]

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب مربی، مربی، استادیار و دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵- استادیار، بخش تحقیقات چغندرقند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رزقان، ایران

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۱**

## چکیده

**واحدی، س.، اوراضی‌زاده، م. ر.، آقائی‌زاده، م.، نوروزی، پ. و بذرافشان، م. ۱۳۹۶.** گزینش لاین‌های اوتایپ چغندرقند مقاوم به بیماری ریزومانیا. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۳:** ۲۸- ۱۷.

**در اصلاح چغندرقند لاین‌های اوتایپ نقش مهمی دارند زیرا از تلاقی آن‌ها با لاین‌های نرعقیم سینگل‌کراس‌های نرعقیمی به دست می‌آید که به‌عنوان پایه مادری در تهیه رقم استفاده می‌شوند. در این بررسی از دو جمعیت اصلاحی منوژرم حامل ژن‌های کنترل کننده صفت اوتایپی و مقاومت به برخی بیماری‌های مهم چغندرقند، ۳۶ لاین اوتایپ منوژرم مقاوم به ریزومانیا تهیه شد. لاین‌ها در سال ۱۳۹۲ از نظر مقاومت به بیماری ریزومانیا در خزانه آلوده در ایستگاه زرقان فارس در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار ارزیابی شدند. در زمان برداشت، ریشه‌های هر کرت از نظر شدت علائم بیماری براساس مقیاس ۹-۱ نمره‌دهی شدند. هم‌زمان کلیه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی پیوسته با ژن مقاومت از نظر حضور ژن مقاومت آزمون مولکولی شدند. در میان لاین‌های اوتایپ مورد بررسی، نمره آلودگی لاین‌های شماره ۳۲۳۰۲ و ۳۲۳۰۴ کمتر از شاهد مقاوم خارجی (رقم ایسلا) بود و در مجموع هجده لاین از نظر متوسط نمره آلودگی به‌همراه دو جمعیت والدینی و شاهد مقاوم در یک گروه آماری قرار گرفتند. درصد حضور ژن برای شاهد مقاوم ۹۲ و برای شاهد حساس صفر بود. در مجموع در ۶۵ درصد موارد بین درصد حضور ژن و متوسط نمره آلودگی ژنوتیپ‌ها در مزرعه توافق وجود داشت.**

**واژه‌های کلیدی: چغندرقند، لاین‌های اوتایپ، بیماری ریزومانیا، نشانگر مولکولی.**

نویسنده مسئول: sdvahedi@yahoo.com تلفن: ۰۲۶۳۲۷۰۲۶۱۳

**مقدمه**

گیاه اوتایپ (O-type) در چغندرقند دارای ژنوتیپ xxzz در هسته، سیتوپلاسم N یا نرمال دارد و حفظ‌کننده خاصیت نرعقیمی است. این گیاه به‌عنوان والد نر در نظر گرفته می‌شود، اگر با یک گیاه ماده کاملا نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS)تلاقی شود، کلیه نتاج کاملا نرعقیم خواهند بود چرا که وضعیت سیتوپلاسمی گیاه از والد ماده به ارث می‌رسد. ژنوتیپ اوتایپ با فراوانی پایینی (۵-۳٪) در اغلب جمعیت‌های گرده‌افشان چغندرقند وجود دارد و از طریق تلاقی آزمون با گیاهان CMS شناسایی می‌شود (Bosemark, 1993)، بنابراین انتخاب و بهبود لاین‌های اوتایپ اینبرد دشوارترین و گران‌ترین بخش برنامه اصلاح رقم هیبرید در چغندرقند است (Bosemark, 1993؛ Owen, 1950). لاین اوتایپ خالص زمانی به دست می‌آید که پس از تلاقی آن با یک لاین کاملا نرعقیم، نتاج به دست آمده از روی پایه مادری پس از کشت، رشد، سرمادهی و گل‌دهی به‌طور کامل نرعقیم باشد. لاین‌های اوتایپ پس از تلاقی با والد مادری نرعقیم غیرخویشاوند تولید پایه مادری (سینگل کراس) می‌کنند. به‌منظور دستیابی به پایه‌های مادری سینگل کراس مقاوم، وجود رگه‌های اوتایپ و نرعقیم مقاوم الزامی است.

در سال ۱۹۵۲ برای اولین‌بار وجود یک بیماری جدید که سبب رشد و تکثیر غیر طبیعی ریشه‌های جانبی در اطراف ریشه اصلی چغندرقند می‌شد توسط کانوا از ایتالیا گزارش شد، وی این بیماری را ریزومانیا یا دیوانگی ریشه نامید (Canova, 1952). عامل این بیماری، ویروسی از گروه بنی‌ویروس‌ها (Benyviruses) به‌نام ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر (*Beet necrotic yellow vein virus*: BNYVV) است که توسط یک قارچ خاکزی (*Polymyxa betae*) انتقال می‌یابد (Scholten, 1997). خسارت بیماری معمولاً بیش از ۳۰ درصد و در مواردی به صد در صد می‌رسد (Asher, 1993).

این بیماری در ایران اولین‌بار در سال ۱۳۷۵ توسط ایزدپناه و همکاران (Izadpanah *et al*., 1996) از فارس گزارش شد و متعاقب آن وجود بیماری در مزارع چغندرقند اکثر نواحی کشور به اثبات رسید به‌طوری که تاکنون از خراسان ، فارس، اصفهان ، کرمانشاه، قزوین ، زنجان ، همدان ، کهگیلویه و بویراحمد ، اردبیل، چهارمحال و بختیاری ، سمنان و لرستان گزارش شده و در برخی موارد به آستانه خسارت اقتصادی رسیده است (Todefallah *et al*., 1999).

برای کنترل (مدیریت) بیماری روش‌های متعددی از جمله عملیات زراعی، مبارزه شیمیایی و مقاومت ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های زراعی شامل کاشت زودهنگام چغندرقند، اجتناب از رطوبت بالا، کم کردن زمان آبیاری و کاهش فاصله آن، جلوگیری از ورود خاک مزرعه آلوده به مزارع

سالم و طولانی کردن دوره تناوب است. علی‌رغم رعایت عملیات زراعی مناسب خسارت بیماری می‌تواند زیاد باشد زیرا این اقدامات تأثیر چندانی در کاهش بیماری ندارند (Todefallah *et al*., 1999).

مقاومت ژنتیکی (ارقام مقاوم) مؤثرترین روش کنترل بیماری ریزومانیا به شمار می‌آید. نتایج حاصل از ارزیابی ژرم‌پلاسم چغندر حاکی از وجود ژن‌های مقاومت هم در ژنوتیپ زراعی و هم در گونه وحشی *Beta maritima* بود (Whitney, 1989). مقاومت موجود در منبع زراعی توسط یک ژن غالب ($Rz_1$) کنترل می‌شود. باتوجه‌به سهولت نسبی وارد کردن این ژن به سایر مواد اصلاحی، امروزه از این منبع به‌طور گسترده در برنامه‌های به‌نژادی چغندرقند استفاده شده است. به‌نظر می‌رسد مقاومت موجود در گونه وحشی فوق‌الذکر بسیار موثرتر از منبع زراعی باشد و استفاده از آن مقاومت ارقام را هرچه بیشتر تضمین کند (Whitney, 1989). اخیراً ژن مقاومت دیگری در راس‌شمار WB41 متعلق به گونه *B. vulgaris* subsp. *maritime* شناسایی و $Rz_3$ نامیده شده است (Gidner *et al*., 2005). گیاهانی که حامل دو ژن $Rz_1$ و $Rz_3$ هستند، در مقایسه با گیاهانی که فقط ژن $Rz_1$ را داشتند، دارای غلظت کمتری از ویروس مولد بیماری بودند (Gidner *et al*., 2005). به‌منظور کنترل موثر بیماری، باید از افزایش معنی‌دار زادمایه بیماری (ویروس عامل بیماری) به خاک جلوگیری کرده و مقاومت ارقام نیز پایدار باشد. مکانیزم مقاومت شامل محدود کردن تکثیر ویروس یا انتقال آن است (Barr *et al*., 1993).

سطح مقاومت ژرم‌پلاسم چغندرقندا (ژنوتیپ‌ها) نیز بستگی به مقدار ویروس در ریشه آن‌ها دارد و بر این اساس ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری شناسایی و گزینش می‌شوند (Tuitert *et al*., 1994؛ Asher and Kerr, 1996). برای شناسایی این‌گونه ژنوتیپ‌ها از روش‌های متعددی استفاده می‌شود که یکی از آن‌ها ارزیابی‌های مزرعه‌ای است. بدین منظور ژنوتیپ‌های مورد نظر در مزرعه آلوده به ریزومانیا کاشته شده و از بین آن‌ها ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری بر اساس ارزیابی علائم بیماری، عملکرد ریشه و مقدار شکر گزینش می‌شوند (Lewellen and Biancardi, 1990).

شولتن و همکاران (Scholten *et al*., 1997) از روش BSA (Bulk Segregant Analysis) برای شناسائی نشانگرهای RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) پیوسته با ژن‌های مقاومت به BNYVV در خانواده‌های درحال تفکیک چهار راس‌شمار مقاوم Holly-1-4 ، R128 ، R104 و WB42 استفاده کردند. نسبت‌های تفکیک مشاهده شده گیاهان مقاوم به حساس در خانواده‌های R128 و Holly-1-4 نشان دهنده وجود یک ژن بزرگ اثر غالب برای مقاومت به BNYVV بود. با این

وجود غلظت ویروس در گیاهان مقاوم دامنه وسیعی داشت که ممکن است ناشی از دخالت ژن‌های کوچک اثر یا تنوع محیطی باشد. نوروزی (Norouzi, 2014) نشان داد که با چند نسل خودگرده‌افشانی لاین‌های چغندرقند حامل ژن مقاومت به نماتد مولد سیست به‌همراه انتخاب ژنوتیپی گیاهان مقاوم با استفاده از نشانگر مولکولی می‌توان به لاین‌هائی با درصد بالای ژن مقاومت دست یافت. استواناتو و همکاران (Stevanato *et al*., 2012) با استفاده از روش BSA در یک جمعیت F2 موفق به شناسایی چند نشانگر مولکولی SNP (Single Nucleotide Polymorphism) پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا شدند. نشانگرهای SNP از نوع هم‌بارز بوده و قادر به تفکیک سه نوع ژنوتیپ حساس، هتروزیگوت مقاوم و هموزیگوت مقاوم به ریزومانیا از یک‌دیگر هستند و می‌توانند برای گزینش به‌کمک نشانگر در مراحل اصلاحی چغندرقند استفاده شوند. نوروزی و همکاران (Norouzi *et al*., 2015) با مقایسه نتایج مولکولی و مقاومت مزرعه‌ای توانستند کارائی چند نوع نشانگر مولکولی پیوسته با ژن مقاومت به ریزومانیا را در غربال لاین‌های اوتایپ تایید کنند.

ارقام چغندرقند ماحصل تلاقی پایه‌های گرده‌افشان (والد پدری) با سینگل کراس‌های نرعقیم (والد مادری) هستند. برای تهیه سینگل کراس، لاین‌های اوتایپ (حفظ کننده نرعقیمی) با لاین‌های نرعقیم غیرخویشاوند متعدد که حتی‌الامکان از نظر زمینه ژنتیکی دور از یک‌دیگرند تلاقی داده شده و بهترین ترکیبات باتوجه‌به جمیع صفات مدنظر به‌عنوان پایه مادری در تهیه ارقام تجاری استفاده می‌شوند. در این تحقیق لاین‌های اوتایپ حاصل از دو جمعیت اصلاحی منوژرم دیپلوئید با کد SB22 و SB23 از نظر مقاومت به بیماری ریزومانیا در شرایط آلودگی طبیعی و هم‌چنین حضور ژن با استفاده از نشانگر مولکولی پیوسته با ژن مقاومت مورد ارزیابی قرار گرفتند. جمعیت‌های مذکور حامل ژن‌های کنترل کننده صفت اوتایپی و هم‌چنین مقاومت به بیماری‌های مختلف چغندرقند از جمله ریزومانیا (ژن $Rz_1$) بودند (Panella and Lewellen, 2005).

## مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۰ از دو جمعیت اصلاحی SB22 و SB23 چغندرقند موجود در بانک ژن موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند هرکدام یک‌صد ریشه تهیه شد. در سال ۱۳۹۱ در ایستگاه تحقیقاتی مطهری کرج هر ریشه به‌همراه ریشه یک لاین نرعقیم زیر یک قفس پارچه‌ای در شرایط ایزوله قرار گرفت. در این قفس‌های پارچه‌ای امکان نفوذ دانه گرده از خارج وجود نداشته و بوته گرده دهنده زیر آن، هم خود و هم بوته نرعقیم هم‌جوار خود را گرده‌افشانی می‌کند. در نتیجه در هر قفس از روی بوته گرده دهنده بذر تمام خواهری

(Full sib) و از روی بوته نرعقیم بذر F1 برداشت شد. مقداری از بذر هر F1 در مهرماه ۱۳۹۱ در گلخانه کاشته شد و در بهار سال ۱۳۹۲ بوته‌های به ساقه رفته از نظر نرعقیمی کنترل شدند. درصورتی که بوته گرده دهنده از خاصیت اوتایپی بالائی برخوردار باشد نتاج حاصل از بوته F1 دارای درصد بالائی از نرعقیمی خواهند بود، در غیر این صورت نسبت بوته‌های نرعقیم به‌شدت کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد بوته گرده دهنده فاقد ژن‌های کنترل کننده خاصیت اوتایپی است. در این بررسی براساس نتایج کنترل نرعقیمی، ۳۶ لاین اوتایپ شناسائی شد که می‌بایست به‌منظور تعیین لاین‌های مقاوم از نظر حضور ژن مقاومت به بیماری ریزومانیا غربال می‌شدند.

برای بررسی مقاومت به بیماری ریزومانیا در این ۳۶ لاین اوتایپ مورد نظر، در سال ۱۳۹۲ آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در خزانه آلوده واقع در ایستگاه زرقان مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس به‌اجرا درآمد. علاوه‌بر لاین‌های اوتایپ، از دو جمعیت والدینی آن‌ها (جمعیت‌های SB22 و SB23) ، جمعیت گرده‌افشان ۱۹۱ به‌عنوان شاهد حساس و یک رقم خارجی (ایسلا) به‌عنوان شاهد مقاوم استفاده شد. هر کرت آزمایشی شامل یک خط به طول ۵ متر و فاصله خطوط ۵۰ سانتی‌متر بود. آزمایش در اوایل اردیبهشت ماه کشت و پس از سه مرحله آبیاری نسبت به تنک و وجین اقدام شد. در طول فصل رشد صفاتی نظیر تعداد بوته پس از تنک، نمره سبزینگی برگ‌ها و نمره یکنواختی رشد یادداشت‌برداری شد. نمره رشد و شدت رنگ برگ براساس مقیاس ۵ – ۱ داده شد که در آن افزایش نمره نشان از یکنواختی رشد و شدت رنگ بیشتر داشت. در زمان برداشت، به ریشه‌های هر کرت باتوجه‌به علائم بیماری روی آن‌ها براساس مقیاس ۹ – ۱ (Luterbacher *et al*., 2005) نمره داده شد. در این مقیاس نمره یک به ریشه‌های فاقد علائم بیماری اختصاص یافته و با افزایش نمره بر شدت ظهور علائم بیماری بر روی ریشه‌ها افزوده می‌شود. از میانگین وزنی نمره‌های آلودگی تک‌بوته‌های مربوط‌به هر لاین، نمره آلودگی آن لاین به دست آمد. داده‌های مربوط‌به نمره آلودگی با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شد و ژنوتیپ‌ها براساس متوسط نمره آلودگی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ گروه‌بندی شدند.

هم‌زمان با اجرای آزمایش در مزرعه آلوده در زرقان، بذر کلیه مواد آزمایشی در کرج و در شرایط گلخانه کاشته شد. در مرحله هشت برگی از دوازده بوته از هر ژنوتیپ به‌تصادف نمونه برگ جهت استخراج DNA تهیه شد تا توسط نشانگر مولکولی بارز ZN1 با پیوستگی کمتر از ۱۰ سانتی‌مورگان با ژن مقاومت غربال شده و حضور ژن در آن‌ها تائید شود. استخراج DNA به‌روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران

(Dellaporta *et al.*, 1983) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش انجام شد. در یک واکنش حجم مورد نیاز DNA به‌میزان ۱ میکرولیتر با غلظت ۵۰ng/µl، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x، ۲ میکرولیتر dNTP ۲/۵ میلی‌مولار، ۱/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر با غلظت ۳۰ ng/µl از جفت آغازگرهای نشانگر بارز ZN1 (نوروزی، نتایج منتشر نشده) و ۰/۲ میکرولیتر(یک واحد) آنزیم SmarTaq پلی‌مراز بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر با مراحل زیر شامل: ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در °C ۹۴، ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، اتصال به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸°C، توسعه آغازگر به‌مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای ۷۲°C برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش انجام شد. سپس محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ الکتروفورز شدند و رنگ‌آمیزی ژل در اتیدیوم‌بروماید و عکس‌برداری در دستگاه مستندساز ژل انجام شد. در انتها حضور و عدم‌حضور نشانگر در تک‌بوته‌ها بر روی ژل مشخص شد.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نمره آلودگی لاین‌های اوتایپ حاکی‌از معنی‌دار شدن اثر تکرار و تیمار در سطح احتمال ۱٪ بود و لاین‌ها از این نظر با یک‌دیگر اختلاف آماری معنی‌دار داشتند (جدول ۱). باتوجه‌به این که بیماری ریزومانیا یک بیماری خاک‌زاد است، مزارع آزمایشی از یکنواختی آلودگی برخوردار نبوده و کرت‌ها از نظر شدت آلودگی دارای تنوع طبیعی بودند که این امر موجب معنی‌دار شدن اثر تکرار شد (Lewellen and Biancardi, 1990). گرده‌افشان ۱۹۱ (شاهد حساس) با کسب نمره آلودگی ۶/۷۵ حساس‌ترین ژنوتیپ آزمایش بود درحالی‌که متوسط نمره آلودگی شاهد مقاوم ۳/۵ به دست آمد (جدول ۲). متوسط نمره آلودگی دو جمعیت والدینی نیز به ترتیب ۳/۷۵ و ۳/۲۵ و بسیار نزدیک به شاهد مقاوم آزمایش بود. لاین‌های اوتایپ مورد بررسی از نظر مقاومت به بیماری تنوع زیادی نشان داده و دامنه تغییرات نمره آلودگی آن‌ها از حداقل ۳/۰۰ تا حداکثر ۶/۲۵ نوسان داشت (جدول ۲). گروه‌بندی آماری لاین‌های مورد بررسی براساس متوسط نمره آلودگی و با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ آن‌ها را در ۹ گروه آماری دسته‌بندی کرد (جدول ۲). یازده لاین اوتایپ با شاهد حساس در یک گروه آماری قرار گرفتند و در آخرین گروه به‌عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری بیست و یک ژنوتیپ شامل هجده لاین اوتایپ، دو جمعیت والدینی و شاهد مقاوم قرار داشتند. در نتیجه از نظر آماری نیمی از لاین‌های مورد

جدول ۱- تجزیه واریانس نمره آلودگی لاین‌های اوتایپ چغندرقند در خزانه آلوده به بیماری ریزومانیا
Table 1. Analysis of variance for rhizomonia infection score of O-type lines of sugar beet in rhizomania nursery

| S.O.V | منابع تغییر | درجه آزادی df. | میانگین مربعات MS |
|---|---|---|---|
| Replication | تکرار | 3 | 7.973** |
| Line | لاین | 39 | 3.372** |
| Error | خطا | 117 | 0.939 |

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.
**: Significant at 1% probability level.

مطالعه نسبت به بیماری مقاومت نشان دادند. نمره آلودگی دو لاین اوتایپ ۳۲۳۰۲ و ۳۲۳۰۴ کمتر از شاهد مقاوم و لاین ۳۲۳۰۶ معادل شاهد مقاوم به دست آمد (جدول ۲).

علی‌رغم این که متوسط نمره آلودگی هر دو جمعیت والدینی نزدیک به شاهد مقاوم و با آن هم‌گروه بود، واکنش نتاج حاصل از آن‌ها مشابه یک‌دیگر نبود. از هر جمعیت هجده لاین در این بررسی شرکت داشت که از شماره ۳۲۲۹۵ تا ۳۲۳۱۲ مربوط به جمعیت SB22 و از شماره ۳۲۳۱۳ تا ۳۲۳۳۰ نتاج جمعیت SB23 بودند. سهم جمعیت SB22 در گروه ژنوتیپ‌های مقاوم شش لاین (حدود ۳۰٪) و سهم جمعیت SB23 دوازده لاین (حدود ۶۰٪) بود (جدول ۲). جالب این که هر دو لاین اوتایپی که نمره آلودگی کمتر از شاهد مقاوم داشتند و هم‌چنین لاینی که نمره آلودگی آن همانند شاهد مقاوم بود هر سه متعلق‌به جمعیت SB22 بودند. با این که مقاومت به بیماری توسط یک ژن اصلی ایجاد می‌شود اما همانند مطالعات سایر محققین (Scholten *et al.*, 1997) دخالت ژن‌های کوچک اثر در واکنش ژنوتیپ‌ها به بیماری کاملا مشهود بود. بدین ترتیب تعداد بیشتری از لاین‌های اوتایپ حاصل از جمعیت SB22 در زمره ژنوتیپ‌های حساس به بیماری دسته‌بندی شدند. مقاومت جمعیت SB23 کمی بهتر از جمعیت SB22 بود و متوسط نمره آلودگی آن از شاهد مقاوم نیز کمتر شد (جدول ۲). بدین ترتیب هیچ‌یک از ۱۲ لاین اوتایپی که از جمعیت SB23 به دست آمده و با شاهد مقاوم هم‌گروه شدند نمره آلودگی کمتر از جمعیت والدینی خود داشتند و می‌توان گفت در این جمعیت از نظر مقاومت به بیماری پیشرفتی حاصل نشد اما در مقابل از شش لاین منتخب در جمعیت SB22 سه لاین (۳۲۳۰۲، ۳۲۳۰۴ و ۳۲۳۰۶) متوسط نمره آلودگی کمتر و دو لاین (۳۲۲۹۵ و ۳۲۳۱۲) معادل نمره آلودگی جمعیت مورد نظر داشتند (جدول ۲).

براساس نتایج حاصل از ارزیابی مولکولی ژنوتیپ‌ها توسط نشانگر پیوسته با ژن مقاومت به بیماری ریزومانیا (*RZ1*)، درصد حضور ژن در شاهد مقاوم آزمایش ۹۲ درصد و در شاهد

جدول ۲- مقایسه متوسط نمره آلودگی لاین‌های اوتایپ چغندرقند به بیماری ریزومانیا، گروه‌بندی آن‌ها و درصد حضور ژن مقاومت در لاین‌ها با استفاده نشانگر مولکولی ZN1

Table 2. Comparison of average infection score of O-type lines of sugar beet to rhizomania classification of them and resistance gene presence percentage in lines using ZN1 molecular marker

| لاین‌های اوتایپ<br>O- type lines | متوسط نمره آلودگی<br>Average infection score | درصد حضور ژن<br>Resistance gene presence percentage |
|---|---|---|
| Susceptible control (191) | 6.75a | 0 |
| 30308 | 6.25ab | 0 |
| 32301 | 6.00abc | 0 |
| 32300 | 6.00abc | 0 |
| 32303 | 6.00abc | 0 |
| 32298 | 5.75abcd | 42 |
| 30309 | 5.50abcde | 42 |
| 32316 | 5.50abcde | 0 |
| 32307 | 5.50abcde | 83 |
| 32313 | 5.25abcdef | 67 |
| 32299 | 5.25abcdef | 67 |
| 32325 | 5.25abcdef | 50 |
| 32322 | 5.00bcdefg | 42 |
| 32328 | 5.00bcdefg | 83 |
| 32311 | 5.00bcdefg | 0 |
| 32297 | 5.00bcdefg | 25 |
| 32296 | 4.75bcdefgh | 58 |
| 32305 | 4.75bcdefgh | 100 |
| 32317 | 4.75bcdefgh | 75 |
| 32310 | 4.50cdefghi | 83 |
| 32330 | 4.50cdefghi | 58 |
| 32320 | 4.50cdefghi | 75 |
| 32318 | 4.25defghi | 83 |
| 32326 | 4.25defghi | 100 |
| 32315 | 4.25defghi | 42 |
| 32323 | 4.25defghi | 67 |
| 32321 | 4.25defghi | 83 |
| 32324 | 4.00efghi | 100 |
| 32327 | 4.00efghi | 100 |
| 32329 | 4.00efghi | 92 |
| 32314 | 3.75fghi | 92 |
| 32312 | 3.75fghi | 58 |
| 32319 | 3.75fghi | 83 |
| 32295 | 3.75fghi | 100 |
| SB 22 | 3.75fghi | 50 |
| 32306 | 3.50ghi | 92 |
| Resistant control (Isella) | 3.50ghi | 92 |
| SB 23 | 3.25hi | 92 |
| 32304 | 3.25hi | 50 |
| 32302 | 3.00i | 58 |

نمره‌های آلودگی با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

Average infection scores with similar letters are not significantly different at 5% probability level.

حساس صفر بود (جدول ۲). این مقدار برای جمعیت SB22 معادل ۵۰ درصد و برای جمعیت SB23 همانند شاهد مقاوم ۹۲ درصد به دست آمد. درصد حضور ژن در لاین‌های اوتایپ از صفر تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. از ۳۶ لاین مورد بررسی در شش لاین اوتایپ حضور ژن همانند شاهد حساس مشاهده نشد و در پنج لاین کلیه بوته‌های مورد مطالعه حامل ژن مقاومت بوده و درصد حضور ژن در آن‌ها ۱۰۰ درصد بود. در سه لاین اوتایپ نیز درصد مورد بحث معادل شاهد مقاوم به دست آمد (جدول ۲). هفت ژنوتیپی که درصد حضور ژن در آن‌ها معادل

صفر بود متوسط نمره آلودگی بالائی نیز در شرایط مزرعه آلوده کسب کردند که نشان می‌دهد نشانگر مورد استفاده برای غربال مواد فاقد ژن و حساس به بیماری کارائی خوب و قابل‌قبولی داشت. اما درصد حضور ژن در مقاوم‌ترین لاین‌های این تحقیق یعنی لاین‌های شماره ۳۲۳۰۲ و ۳۲۳۰۴ که متوسط نمره آلودگی آن‌ها در مزرعه به‌ترتیب معادل ۳/۰۰ و ۳/۲۵ به دست آمد برابر با ۵۸ و ۵۰ درصد بود که نشان از توافق خوب نشانگر مورد نظر با مقاومت این لاین‌ها ندارد. البته در ژنوتیپ‌هایی که درصد حضور نشانگر در مقایسه با میانگین نمره آلودگی کمتر از حد انتظار بود شاید عدم تکثیر باند نشانگر در شرایط واکنش PCR یکی از علل آن باشد که درصد حضور نشانگر را کمتر از واقع نشان داد. هم‌چنین در برخی ژنوتیپ‌های حساس با میانگین نمره آلودگی بین ۵ تا ۶ درصدهای متفاوتی از حضور نشانگر مذکور به دست آمد که یکی از علل آن می‌تواند میانگین گرفتن از نمره آلودگی چند ریشه مربوط‌به هر ژنوتیپ باشد که ممکن است به‌علت تنوع زیاد در مقاومت تک‌ریشه‌ها و در عین‌حال میانگین بالای آلودگی نتواند ارتباط مناسبی بین نتایج مولکولی با مقاومت مزرعه‌ای به دست آید. به‌عبارتی برای تعیین توافق بین نتایج مولکولی و مقاومت شاید بهتر این بود که ارتباط نمره آلودگی تک‌ریشه‌ها با حضور یا عدم‌حضور باند نشانگر مولکولی تعیین و محاسبه می‌شد که در این صورت نتایج مشخص‌تری به دست می‌آمد. متوسط نمره آلودگی پنج لاین اوتایپی که درصد حضور ژن در آن‌ها ۱۰۰ درصد بود از ۳/۷۵ تا ۴/۷۵ نوسان داشت و هیچ‌یک کمتر از شاهد مقاوم آزمایش نبود (جدول ۲). البته باید این نکته را نیز در نظر داشت که درصد حضور ژن براساس دوازده بوته به دست آمده است و به احتمال قوی درصورت افزایش تعداد بوته نتایج به واقعیت بیشتر نزدیک می‌شد. در هر حال باتوجه‌به نتایج حاضر، درصورت اکتفا به نشانگر و غربال توسط آن تعدادی از لاین‌های بسیار مقاوم از دست می‌رفت و درمقابل لاین‌هائی با مقاومت کمتر باقی می‌ماند. درمجموع از ۴۰ ژنوتیپ مورد بررسی در مورد ۲۶ ژنوتیپ بین درصد حضور ژن و متوسط نمره آلودگی آن‌ها در مزرعه توافق وجود داشت که معادل ۶۵ درصد است. به‌نظر می‌رسد در مواردی که تعداد مواد اصلاحی مورد ارزیابی زیاد باشد، از نشانگر موجود می‌توان برای غربال لاین‌های حساس و حذف آن‌ها استفاده کرد و سپس لاین‌های باقی‌مانده را در شرایط آلودگی طبیعی ارزیابی تکمیلی کرد. نوروزی و همکاران (Norouzi *et al.*, 2013) از یک نشانگر ناجفت برای بررسی اثر دز ژن مقاومت به ریزومانیا استفاده کردند و نتیجه گرفتند که ژنوتیپ‌های هموزیگوت غالب نسبت به هتروزیگوت‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند.

علی‌رغم این که براساس نتایج آماری لاین‌هائی که متوسط نمره آلودگی آن‌ها ۴/۵۰

و کمتر از آن بود با لاین بسیار مقاوم ۳۲۳۰۲ هم‌گروه شده اند (جدول ۲)، اما با سخت‌گیری بیشتر و انتخاب لاین‌هائی با نمره آلودگی کمتر از ۴/۰۰ هفت لاین اوتایپ مقاوم به بیماری رایزومانیا به دست آمد که قریب به ۲۰ درصد لاین‌ها را شامل می‌شود. نتایج حاصل از کنترل نرعقیمی در نتاج حاصل از این لاین‌ها امیدوار کننده بود و در پنج لاین نرعقیمی نتاج بالای ۸۰ درصد بود که نشان از وجود خاصیت اوتایپی بالا در لاین‌های برگزیده دارد. درصورت اعمال یک چرخه مکمل از برنامه کیج‌گذاری با استفاده از پنج جفت برگزیده می‌توان به تعداد زیادی لاین اوتایپ با مقاومت خوب نسبت به بیماری ریزومانیا دست یافت.

## References


**Asher, M. J. C. 1993.** Rhizomania. pp. 311-346. In: Cooke, D. A,, and Scott, R. K. (eds.) The Sugar Beet Crops (Science Into Practice). Chapman & Hall, London, UK.

**Asher, M. J. C., and Kerr, S. 1996.** Rhizomania: Progress with resistant varieties. British Sugar Beet Review 64: 19-22.

**Asher, M. J. C. and Thompson, K. 1987.** Rhizomania in Europe. British Sugar Beet Review 55: 24-28.

**Barr, K. J., Asher, M. J. C., and Lewis, B. G. 1993.** Resistance to *Polymyxa betae* in wild Beta species. Plant Pathology 44: 301-307.

**Bosemark, N.O. 1993.** Genetics and breeding. pp. 66-119. In: Cooke, D. A., Scott, R. K. (eds.) The Sugar Beet Crops (Science Into Practice). Chapman & Hall, London, UK.

**Canova, A. 1952.** Si studia la rhizomania della bietola. Inf. Fitopatol. 10: 235- 239.

**Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983.** A plant DNA mini preparation version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.

**Gidner, S., Lennefors, B. L., Nilsson, N. O., Bensefelt, J., Johansson, E., Gyllenspetz, U., and Kraft, T. 2005.** QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source of sugar beet. Genome 48: 279-285.

**Izadpanah, K., Hashemi, P., Pakniat, R., Sahanpour, M., and Masoumi, M. 1996.** Extensive existence of root beard disease (rhizomania) in Fars. Journal of Plant Pathology 32: 200-206.

**Lewellen, R. T., and Biancardi, E. 1990.** Breeding and performance of rhizomania resistant sugar beet. Proceedings of the 53th IIRB Congress, Brussels. pp. 69-87.

**Luterbacher, M. C., Asher, M. J. C., Beyer, W., Mandolino, G., Scholten, O. E., Frese, L., Biancardi, E., Stevanato, P., Mechelke, W., and Slyvchenko, O. 2005.** Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm: Soil borne diseases. Euphytica 141: 49-63.

**Norouzi, P. 2014.** Molecular evaluation and increase of cyst nematode resistance gene frequency during several generations of self-pollination in sugar beet. Journal of Crop Breeding 6(13): 49-60. (in Persian).

**Norouzi, P., Rahmani, D., Oroojalian, S., Mahmoudi, S. B., Aghaiezadeh, M., Kakueinezhad, M., Orazizadeh, M.R., Vahedi, S., and Fathi, M. R. 2013.** Confirmation of repulsion molecular markers linked to rhizomania resistance gene (*Rz1*) and evaluation of gene dose effect in sugar beet genotypes. Sugar Beet Journal 29(2): 129-144. (in Persian).

**Norouzi, P., Sabzehzari, M., and Zeinaly, H. 2015.** Efficiency of some molecular markers linked to rhizomania resistance gene ($Rz_1$) for marker assisted selection in sugar beet. Journal of Crop Science and Biotechnology 18: 319-323.

**Owen, F. V. 1950.** The sugar beet breeder's problem of establishing male- sterile populations for hybridization purposes. Proceedings of American Society of Sugar Beet Technology 6: 191-194.

**Panella, L., and Lewellen, R. T. 2005.** Registration of FC301, monogerm, O-type sugar beet population with multiple disease resistance. Crop Science 45: 2666-2667.

**Scholten, E. O. 1997.** Characterization and inheritance of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in Beta. Ph. D. Thesis, Wageningen Agricultural University, Wagenengen, The Netherlands.

**Scholten, O. E., Klein-Lankhorst, R. M., Esselink, D. G., De Bock, Th. S. M., and Lange, W. 1997.** Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta accessions. Theoretical and Applied Genetics 94: 123-130.

**Stevanato, P., Trebbi, D., Norouzi, P., Broccanello, C., and Saccomani, M. 2012.** Identification of SNP markers linked to the $Rz_1$ gene in sugar beet. International Sugar Journal 114: 715-718.

**Todefallah, M., Arjmand, N., and Mahmoudi, S. B. 1999.** Study on infection condition and extension of sugar beet rhizomania disease in Iran. Proceedings of 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan Industrial University Isfahan, Iran (in Persian).

**Tuitert, G., Musters-Van Oorschot, P. M. S., and Hiejbroek, W. 1994.** Effect of sugar beet cultivars with different levels of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* on transmission of virus by *Polymyxa betae*. European Journal of Plant Pathology 100: 201- 220.

**Whitney, E. D. 1989.** Identification, distribution and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. Plant Disease 73: 287-290.