آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۹۱، شماره ۱، شهریور ۱۴۰۲
Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 91, No. 1, Sep. 2023
DOI: 10.22092/JAEP.2023.361223.1467

مقاله پژوهشی

ارزیابی هیبریدهای چغندرقند برای مقاومت دوگانه به بیماری‌های ریزومانیا و پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه

مهیار شیخ الاسلامی[1]✉، شیرین فرزاد فر[2]

۱- دانشیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران؛ ۲- دانشیار، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲)

چکیده

در این تحقیق بذور ۱۲ هیبرید چغندر قند به‌همراه چهار ژنوتیپ شاهد در شرایط میکروپلات کاشته شدند. پس از ارزیابی ریشه‌ها در مقابل *Rhizoctonia solani* AG 2-2 شش ژنوتیپ که دارای کمترین میزان آلودگی قارچی بودند، انتخاب و واکنش آن‌ها نسبت به‌بیماری ویروسی ریزومانیا آزمایش شد. پس از بررسی ده نمونه خاک از مزارع استان کرمانشاه و میکروپلات‌های واقع در ایستگاه تحقیقاتی ماهیدشت آلودگی میکروپلات‌های محل آزمایش به ریزومانیا بر اساس روش های سرولوژیکی و مولکولی تأیید شد. بذور شش ژنوتیپ انتخابی داخل خاک سترون کاشته شده و گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی به‌داخل میکروپلات منتقل شدند. ریشه‌ها پس از برداشت از نظر آلودگی به BNYVV با استفاده از روش الایزا ارزیابی و بر اساس آزمون مقایسه‌ای دانکن در سه گروه قرار گرفتند. در مجموع با توجه به مقاومت مطلوب ژنوتیپ هیبرید (7112*SB36) *S1-92309 نسبت به‌هر دو بیماری، استفاده از والدین این هیبرید برای ادامه آزمایش‌های اصلاحی پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اصلاح نباتات، بوته میری، میکروپلات، ویروس

Evaluation of sugar beet hybrids for dual resistance to Rhizomania and Rhizoctonia root rot diseases

M. SHEIKHOLESLAMI[1]✉, SH. FARZADFAR[2]

1. Associate professor, Plant Protection Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran; 2. Associate professor, Virology Research Department, Iranian Research institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization AREEO, Tehran, Iran

Abstract

In this research, the seeds of 12 sugar beet hybrids along with four control genotypes were planted in microplot conditions. After evaluating the roots against *Rhizoctonia solani* AG 2-2, the six genotypes that had the lowest amount of fungal infection were selected and tested for their reaction to Rhizomania virus disease. After examining ten soil samples from the farms of Kermanshah province and microplots located in Mahidasht research station, the contamination of the microplots of the experimental site with Rhizomania was confirmed based on serological and molecular methods. The seeds of six selected genotypes were planted in sterile soil and the seedlings were transferred to the microplate at the four-leaf stage. After harvesting, the roots were evaluated for BNYVV contamination using the ELISA method and based on Duncan's comparative test, they were divided into three groups. In general, due to the favorable resistance of the hybrid genotype (SB36*7112)* S1-92309 to both diseases, the use of the parents of this hybrid is suggested to continue for breeding experiments.

Keywords: Damping-off, microplot, plant breeding, virus

✉ **m1sheikh@yahoo.com**

©2023, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

مقدمه

بیماری ویروسی ریزومانیا و پوسیدگی قارچی ریزوکتونیایی ریشه چغندرقند از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول هستند که به‌دلیل خاکزاد بودن و پیچیدگی چرخه زندگی، کنترل آن‌ها بسیار دشوار است. روش‌های به‌زراعی نظیر تغییر تاریخ کاشت، تناوب، کود سبز و مبارزه شیمیایی و بیولوژیکی در کاهش خسارت بیماری پیشنهاد و استفاده شده‌است، اما میزان اهمیت و تأثیر آن‌ها در کاهش خسارت بیماری‌ها به اندازه استفاده از ارقام مقاوم مؤثر نیست. استفاده از ارقام مقاوم مؤثرترین و امن‌ترین روش زیست‌محیطی در مدیریت بیماری‌های گیاهی است (Panella and Ruppel, 1996). در برخی از کشورها با اجرای برنامه‌های اصلاحی مستمر و با استفاده از توده‌های مقاوم، چغندرقندهای گرده‌افشان و لاین‌های مقاوم به بیماری‌های خاکزی تولید نموده‌اند که از آن‌ها در تهیه ارقام تجاری استفاده می‌شود (Buttner *et al*., 2004; Hecker and Ruppel, 1976).

در سال‌های اخیر بیماری ویروسی ریزومانیا بیش از هر بیماری دیگر چغندرقند مورد توجه محققین قرار گرفته است. خسارت بسیار شدید این بیماری، پیچیدگی چرخه زندگی ویروس عامل آن (*Beet necrotic yellow vein virus*-BNYVV)، ناقل پلاسمودیوفوری (*Polymyxa betae*)، پایداری طولانی مدت ناقل عامل بیماری در خاک و دشواری کنترل بیماری از دلایل این موضوع هستند. این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۵ تحت عنوان بیماری شبه ریزومانیا از استان فارس گزارش گردید (Izadpanah *et al*., 1996). میزان آلودگی به ریزومانیا در استآن‌های مهم تولیدکننده چغندرقند شامل آذربایجان غربی، خراسان رضوی، خراسان شمالی، خراسان جنوبی و کرمانشاه به‌ترتیب ۳۹/۱، ۳٤/۵، ۱۵/۲، ۱٦ و ٤۸/۸ درصد مزارع چغندر قند برآورد شده است (Pourrahim *et al*. 2015). ویروس عامل بیماری میله‌ای شکل و چند پیکره‌ای است. بیشتر جدایه‌ها چهار نوع RNA ژنومی تک رشته‌ای مثبت با وزن مولکولی ٦۰۰،۷۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۳۰۰ کیلو دالتون دارند (Brunt *et al*. 1996; Rush and Heidel 1995; Wiseler *et al*. 1994).

در بعضی جدایه‌های ویروس از ژاپن، چین، قزاقستان و فرانسه، علاوه بر چهار RNA فوق یک RNA شماره ۵ نیز گزارش شده‌است.

روش‌های توصیه‌شده برای کنترل بیماری شامل تناوب طولانی، زهکشی مناسب، تهویه خاک، کشت زودهنگام و مهم‌تر از همه استفاده از ارقام مقاوم است (Tosic *et al*. 1985; Kaya 2009). منبع مقاومت به ریزومانیا اولین‌بار در آمریکا یافت شد. ژرم‌پلاسم مقاوم دارای یک ژن مقاومت بنام *Rz1* بود که به ژن Holly شهرت یافت و از آن پس در برنامه اصلاح چغندرقند و تولید ارقام مقاوم به بیماری استفاده شد (Biancardi *et al*., 2002; Amiri *et al*., 2003). بهره‌گیری از منابع ژنتیکی جدید مقاومت و هرمی‌کردن چندین ژن مقاومت در خطوط اصلاحی جدید به اولویت اصلی شرکت‌های کشت چغندرقند برای حفظ سطح مقاومت کافی در برابر ریزومانیا تبدیل شده است. (De biaggi *et al*., 2010). با توجه به سهولت نسبی وارد نمودن این ژن به‌سایر مواد اصلاحی، امروزه از منبع Holly به‌طور گسترده‌ای در برنامه‌های اصلاحی چغندرقند استفاده می‌شود، به‌طوریکه اکثر ارقام مقاوم موجود دارای این منبع مقاومت هستند (Scholten and lange, 2000). در حال حاضر شرکت های خصوصی تولید بذر در اروپا مثل KWS و SESVANDERHAV درصدد تهیه ارقام مقاوم با استفاده از منابع مقاومت تک ژنی و چند ژنی هستند و ارقامی با مقاومت تک ژنی در سطح تجاری به بازار عرضه شده‌است. با توجه به وسعت آلودگی مزارع به ریزومانیا در استان‌های مختلف کشور، رقم زرقان به‌عنوان رقم تجاری متحمل به ریزومانیا تهیه و معرفی شد، اما این رقم پس از دو سال مقاومت خود را از دست داد (Mesbah *et al*., 2007). در بررسی‌های انجام شده در موسسه تحقیقات چغندرقند هفت هیبرید امیدبخش به‌همراه شاهد داخلی حساس و دو شاهد خارجی بررسی شدند. با محاسبه شدت آلودگی در دو سال آزمایش، هیبرید SB27×(7111×SB36) به‌دلیل عملکرد بالای ریشه و میزان قند، وضعیت رشد و یکنواختی بیشتر ریشه و همچنین آلودگی کمتر به بیماری به‌عنوان هیبرید برتر معرفی

شد. این هیبرید هم‌اکنون با نام تجارتی شکوفا در دسترس کشاورزان است (Mohammadian *et al*., 2017).

عامل بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه چغندرقند قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn است و یکی از خطرناک‌ترین و رایج‌ترین بیماری‌های این زراعت در مناطق مختلف دنیا می‌باشد. این قارچ موجب مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه، شانکر خشک ریشه و پوسیدگی ریشه‌های انبار شده می‌شود (Sneh *et al*., 1996). پوسیدگی ریزوکتونیایی در بیشتر مناطق چغندرکاری ایران وجود دارد به‌طوری‌که از حدود یک سوم نمونه‌های با علایم پوسیدگی ریشه طی سال‌های۸۳–۷۸ بیمارگر ریزوکتونیا جداسازی شده‌است (Mahmoudi *et al*., 2004). قارچ *R. solani* به‌عنوان مهم‌ترین عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند در استان کرمانشاه شناخته شده است (Sheikholeslami *et al*., 2005). گروه‌های آناستوموزی مختلفی از روی ریشه‌های پوسیده چغندر قند گزارش شده است. ویندل و نابن (۱۹۸۹) طی بررسی‌های خود گروه‌های آناستوموزی AG1، AG2-1، AG2-2، AG-3 AG-4 و AG-5 را از چغندرقند گزارش کردند. اما بر اساس گزارش‌های مختلف، بیماری‌زایی گروه‌های آناستوموزی AG-4 و AG-2-2 در چغندرقند از دیگر گروه‌های آناستوموزی شدیدتر است (Windels and Nabben 1989; Abbasi moghadam and Rastegar, 1990). رابطه بین بیماری‌های ریشه‌ای چغندرقند ناشی از قارچ‌های مختلف و تولید شکر در آمریکا نشان داده است که به ازای هر یک درصد افزایش بیماری بوته‌میری و پوسیدگی ریشه، ۸۰–۷۰ کیلوگرم شکر در هکتار خسارت وارد می‌شود (Harveson *et al*., 2002). در اروپا، پوسیدگی ریزوکتونیایی به‌صورت یک مشکل جدی نمایان شده و ۱۳ درصد مزارع هلند، هشت درصد مزارع اسپانیا، پنج درصد مزارع فرانسه و یونان و دو درصد مزارع ایتالیا و آلمان تحت تأثیر این بیماری قرار گرفته‌است. نتایج مطالعات اولیه در فورت کولینز (آمریکا) نشان داد که مقاومت در چغندرقند نسبت به ریزوکتونیا پلی‌ژنیک بوده و مشتمل بر حداقل دو مکان ژنی با دو یا سه آلل به‌همراه برخی ژن‌های تغییردهنده (modifier) است (Panella and Ruppel, 1996). کنترل شیمیایی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند مشکل است. تدخین خاک در تلفیق با استفاده از ارقام مقاوم برای کاهش خسارت بیماری‌های خاک‌زاد چغندرقند توصیه شده‌است (Harveson and Rush, 1994). در ژاپن با استفاده از قارچ کش آزوکسی استروبین بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه چغندرقند را مدیریت کرده‌اند (Uchino *et al*., 1997). برای کنترل بیماری، تناوب تأثیر محدودی دارد و مبارزه شیمیایی نیز مشکل و هزینه‌بر است. همچنین استفاده از روش‌های مبارزه بیولوژیک نیز در سطح وسیع میسر نیست. بنابراین بهترین راه مقابله با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد (Buttner *et al*., 2004). بر اساس نظر کرنلیسن و همکاران (۱۹۹۶) در ایالات متحده آمریکا با وجود این که بیش از ۱۷ ژرم پلاسم مقاوم به *R. solani* تولید شده است ولی به‌دلیل ظهور نژادهای جدید بیمارگر معمولاً مقاومت از بین می‌رود و باید ژرم پلاسم جدید تولید گردد (Cornelissen *et al*., 1996). در راستای تهیه ارقام مقاوم به *R. solani* در دنیا گام‌هایی برداشته شده‌است و ژنوتیپ های FC709-2 و FC727 مقاومت مطلوبی را نسبت به پوسیدگی ریزوکتونیایی نشان داده‌اند (Panella *et al*., 1995; Panella and Ruppel, 1997). در ایران نیز تولید ارقام مقاوم با استفاده از این ژن‌ها در دست انجام است (Mahmoudi *et al*., 2003) . در سال‌های اخیر نتایج بررسی و غربال ژنوتیپ‌های مختلف برای مقاومت نسبت به این بیماری‌ها نشان داد که لاین‌ها و ارقام تجاری عکس‌العمل متفاوتی نسبت به جدایه‌های *R. solani* داشتند. در این آزمایش‌ها مشخص گردید که لاین‌های مقاوم به *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid نسبت به *R. solani* نیز مقاومت دارند، اما لاین‌های مقاوم به خشکی نسبت به *R. solani* حساسیت نشان دادند. در این آزمایش لاین B8618 نسبت به هر دو بیمارگر مقاومت خوبی نشان داد (Mahmoudi and Ghashghaie, 2012). همچنین لاین‌های نرعقیم و او– تایپ (o-types) مقاوم به‌پوسیدگی ریزوکتونیایی شناسایی شده است (Hasani *et al*., 2019). در تحقیق محمودی و همکاران

سینگل کراس (28-301*25-201) با ۹۰ درصد حضـــور ژن *Rz1* و غلظت ویروس (BNYVV) درحد شـــاهد مقاوم رقم تجارتی بریجیتا و بیشترین عملکرد شکر در تلاقی با دو گرده افشان (SB36-S1-3) و (93-33345) به‌عنوان والد مادری برتر برای تهیه هیبریدهای جدید معرفی شده است (Mahmoudi *et al*., 2020). در ارزیابی مقاومت لاین‌های اصلاحی چغندرقند نسبت به‌پوسیدگی ریزوکتونیایی بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های دوساله آزمایش و تجزیه خوشه‌ای، نشان داده است که سه رگه از نظر مقاومت به‌عامل بیماری و ۱۱ لاین از نظر شاخص برداشت نسبت به شاهدمقاوم (SB19) برتر تشخیص داده شدند. بقیه رگه‌ها با شاهد مقاوم در یک گروه آماری قرار داشتند، گرچه شاخص بیماری یکی از لاین‌ها نسبت به شاهد مقاوم بالاتر بود (Ebrahimi Koulaei *et al.*, 2010). در تحقیق لیو و همکاران (Liu *et al*., 2019) که با استفاده از سه رقم حساس، نسبتا مقاوم و مقاوم به *R. solani* انجام شد این ارقام بدون توجه به‌سطح مقاومت آن‌ها نسبت به بیمارگر قبل از رسیدن به سن ٤ تا ٥ هفتگی بسیار حساس بودند. در آزمایش ٥١ لاین اوتایپ به‌همراه شاهد، گروه‌بندی ژنوتیپ‌های اوتایپ بر اساس شاخص انتخاب ژنوتیپ ایده‌آل (SIIG) نشان داد که ژنوتیپ‌های شماره ١٩ (FCOT 990094)، ٩٠ (FCOT 990084)، ٤ (FCOT 990079) ، ٣٠ (FCOT 990105) و ٤٧ (FCOT 990122) به‌ترتیب با مقادیر ٠/٧٠١، ٠/٧٠٨، ٠/٧٤١، ٠/٨٢٤ و ٠/٨٥٤ نزدیک‌ترین ژنوتیپ ها از نظر مقاومت به ریزوکتونیا بودند (Hamze *et al*., 2022).

نظر به‌اهمیت تولید لاین‌های مقاوم و کاهش خسارت ناشی از این دو بیماری خاکزاد، در این بررسی ابتدا واکنش بذور ۱۲ هیبرید چغندرقند به‌همراه چهار ژنوتیپ شاهد در شرایط میکروپلات در برابر *R. solani* AG-2-2 مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تجزیه و تحلیل آماری شش ژنوتیپ (شامل پنج هیبرید و یک ژنوتیپ شاهد) با کمترین میزان آلودگی قارچی انتخاب و به‌منظور بررسی مقاومت در برابر بیماری ویروسی ریزومانیا انتخاب و آزمایش شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب ژنوتیپ‌ها

در این مرحله ابتدا بذور ۱۲ هیبرید منوژرم حاصل از تلاقی گرده افشان‌های دارای ژن مقاومت به‌هر دو بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی و ریزومانیا و پایه‌های مادری نرعقیم دارای صفات زراعی مطلوب به‌همراه چهار ژنوتیپ شاهد در درون میکروپلات در ایستگاه تحقیقاتی ماهیدشت کرمانشاه در اردیبهشت سال ١٣٩٤ کاشته شدند (جدول ۱). هر ژنوتیپ در سه خط در میکروپلات‌های مختلف به‌صورت تصادفی به‌عنوان سه تکرار کاشته شد.

جدول ۱- اسامی هیبریدها و ژنوتیپ‌های مورد بررسی

Table 1. Names of hybrids and genotypes examined

No	Abbreviated name of hybrid
1	(7112*SB36)* S1-92298
2	(7112*SB36)* S1-92304
3	(7112*SB36)* S1-92309
4	(7112*SB36)* S1-92311
5	(7112*SB36)*S1-92329
6	(7112*SB36)*S1-92151
7	(7112*SB36)*S1-92153
8	(7112*SB36)*S1-92156
9	(7112*SB36)*S1-92159
10	(7112*SB36)*S1-92176
11	(7112*SB36)*S1-92177
12	(7112*SB36)*S1-92180
13	SBSI-3 Control
14	SBSI-4 Control
15	F-20707 Control
16	F-20680 Control

ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها نسبت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه

برای تهیه زاد مایه قارچ *R. solani* جدایه قارچ از گروه آناستوموزی AG-2-2 (تهیه شده از موسسه تحقیقات چغندرقند) روی گندم سترون تکثیر شد. پس از رسیدن بوته‌ها به سن هشت هفتگی پای بوته‌ها را کنار زده و حدود دو گرم مایه قارچ برای هر ریشه استفاده و مجدداً روی آن‌ها خاک برگردانده و بلافاصله آبیاری شد (Mahmoodi *et al*. 2004). عملیات داشت بوته‌ها به‌طور معمول انجام و برداشت ریشه‌ها در مهرماه انجام

و پس از برش طولی آن‌ها برای ارزیابی بوته ها نسبت به پوسیدگی ریزوکتونیایی از روش باتنر و همکاران استفاده شد (Buttner *et al*., 2004). این روش مبتنی بر مقیاس ۱ تا ۹ و به شرح زیر است.

نمره ۱ گیاهان با ریشه‌های سالم (فاقد لکه یا زخم روی ریشه)

نمره ۲ حدود یک درصد سطح ریشه دارای زخم ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۳. یک تا ۵ درصد سطح ریشه دارای زخم ناشی از ریزوکتونیا

نمره ٤ پنج تا ۱۰ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۵ ده تا ۲۵ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ٦ بیست و پنج تا ۵۰ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۷ پنجاه تا ۷۵ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۸ بیش از ۷۵ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۹ گیاهان مرده، ریشه کاملاً پوسیده

شاخص بیماری (DI) به‌صورت زیر تعیین گردید.

مجموع (تعداد گیاهان در آن سطح × سطح بیماری)

مجموعه گیاهان در کرت مورد ارزیابی

داده‌های به‌دست آمده از شاخص بیماری در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS-9.1 آنالیز شدند.

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری ریزومانیا

تهیه خاک‌های آلوده به بیماری ریزومانیا

در این مرحله ابتدا نمونه خاک‌هایی از هشت منطقه با سابقه آلودگی به بیماری ریزومانیا در حوزه کارخانه‌های قند بیستون و اسلام‌آباد غرب به همراه دو نمونه خاک از میکروپلات‌های محل آزمایش و مزرعه تحقیقاتی ایستگاه ماهیدشت تهیه گردید (جدول۲). این خاک‌ها به‌نسبت یک به‌یک با ماسه سترون مخلوط گردید و سپس در گلدان ریخته و بذر رقم حساس ۷۲۳۳ در آن کاشته شد و گلدان‌ها در شرایط معمول نگهداری شدند. پس از گذشت ٤۵ روز، گیاهان از داخل گلدان‌ها خارج و به‌منظور اطمینان از وجود آلودگی به‌ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند، ریشه آن‌ها با دو روش سرولوژیکی الایزا (Clark and Adams 1977) و مولکولی RT-PCR (Meunier *et al*., 2003) بررسی شد. در مورد هر نمونه خاک حداقل سه تا پنج گیاهچه چغندرقند ترجیحاً با علایم مشکوک به بیماری ریشه‌ریشی انتخاب و علاوه بر ثبت علایم آن‌ها، از نظر آلودگی به BNYVV مورد آزمون قرار گرفتند.

جدول ۲- محل جمع‌آوری نمونه‌های خاک.

Table 2. Location of soil samples collection

No.	Sample code	County	Rural district	Village
1	SHV-1	Eslamabad-Gharb	Shian	Ghaleh-shian
2	SHV-5	Eslamabad-Gharb	Shian	Mirazizi
3	SHV-K	Eslamabad-Gharb	Shian	Ghobad
4	SHA-1	Eslamabad-Gharb	Southern suburbs	Moumei
5	SHA-9	Eslamabad-Gharb	Southern suburbs	Amirabad
6	SAV-2	Sahneh	Gamasiab	Mahmoudabad
7	KG-1	Kangavar	suburbs	Karkhaneh
8	KG-2	Kangavar	suburbs	Ring road
9	MAH-F	Kermanshah	Mahidasht	Mahidasht research station
10	MICROPLOT	Kermanshah	Mahidasht	Mahidasht research station

آزمون سرولوژیکی الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA)

برای انجام آزمون الایزا (Clark and Adams 1977) از آنتی‌بادی اختصاصی BNYVV تهیه شده از شرکت بیوربا سویس و طبق غلظت‌های توصیه شده توسط آن شرکت استفاده شد. ابتدا محلول آنتی‌بادی اختصاصی در بافر پوششی (pH 9.6) شامل (Na_2CO_3 15mM, $NaHCO_3$ 35mM) به‌نسبت ۱/۱۰۰۰ (توصیه شده توسط شرکت) تهیه شد. سپس به‌هر چاهک بشقابک الایزا ۱۰۰ میکرولیتر اضافه و به‌مدت یک شب در ٤ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سه بار شستشوی بشقابک الایزا با بافر شستشو (pH 7.4) (شامل PBS: 3mM KCl, Na_2HPO_4 3mM, NaCl 8 mM به اضافه ۰/۵ درصد Tween 20)، عصاره تهیه شده از ریشه در بافر PBS حاوی دو درصد PVP-24000 و ۰/۵ درصد Tween 20، (با نسبت یک به پنج) به‌هر چاهک اضافه شد. پس از نگهداری به‌مدت یک شب در یخچال، بشقابک همانند مرحله قبل شسته شده و به‌هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی متصل به آنزیم (کانجوگیت) در بافر PBS حاوی دو درصد PVP-24000 و ۰/۵ درصد Tween 20 (رقیق شده به‌نسبت ۱/۱۰۰۰ طبق توصیه شرکت سازنده) افزوده شد. بشقابک پس از چهار ساعت نگهداری در یخچال شستشو داده شده و به‌هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (شامل بافر ۰/۱ مولار دی‌اتانول‌آمین اسیدیته ۹/٦ حاوی یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پارا نیترو فنیل فسفات) اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت میزان جذب نوری چاهک‌ها در ٤۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه Elisa-reader (مدل BioTech-ELX808، آمریکا) اندازه‌گیری شد. چاهک‌هایی که میزان جذب نوری آن‌ها بیشتر از سه برابر میانگین نمونه سالم بود، به‌عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شدند.

آزمون RT-PCR

به‌منظور تأیید نتایج آزمون‌های سرولوژیکی، از روش مولکولی RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction) جهت بررسی نمونه‌های مورد نظر استفاده شد. برای این منظور از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده استفاده شد (Meunier *et al.* 2003). جهت استخراج آر.ان.ای از محلول تجاری RNX plus (سیناکلون، ایران) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت ریشه پس از انجماد سریع توسط ازت مایع، در هاون سرد و سترون له شد. پودر بدست آمده به‌یک میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر از محلول تجاری RNX plus منتقل شد. این محلول به‌مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار گرفته و سپس به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد افزوده و پس از یک ورتکس شدید به‌مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از میانگریز به‌مدت ۱۵ دقیقه در چهار درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰g، رونشین شفاف به‌یک میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده و به آرامی هم زده شد. مخلوط مورد نظر به‌مدت یک ساعت در ۲۰- درجه قرار داده شده و همانند مرحله قبل میانگریز گردید. رونشین حذف و رسوب با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. سپس رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب عاری از RNase-DNase حل گردید. برای اطمینان از استخراج صحیح آر.ان.ای، از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (شامل ۵/۵ گرم اسید بوریک، ۱۰/۸ گرم تریس و ٦/۸ گرم Na_2EDTA در یک لیتر آب) استفاده شد. نمونه‌ها در ۸۰ ولت ثابت الکتروفورز شدند و بعد از گذشت حدود ۳۰ دقیقه برای مشاهده و عکس‌برداری از باندهای آر.ان.ای از دستگاه UV-illuminator (Imaco، هلند) استفاده شد.

مرحله رونوشت برداری برگردان در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. اجزای هر واکنش شامل یک میکرولیتر از آغازگر پایین دست (reverse primer) با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، دو میکرولیتر بافر M-MuLV-10X (سیناکلون، ایران)، دو میکرولیتر از مخلوط dNTP Mix با غلظت ۱۰ میلی مولار (سیناکلون، ایران)، چهار میکرولیتر از آر.ان.ای استخراج شده، یک میکرولیتر از آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (Revert Aid M-MuLV)، نیم میکرولیتر (RNase inhibitor) (Fermentas، لیتوانی) با ۹/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون بود. برای انجام واکنش ابتدا آغازگر پایین‌دست

(5'-ACCCCAACAAACTCTCTAAC-3') به‌همراه آر.ان.ای استخراج شده به میکروتیوب اضافه و پس از پنج دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس بلافاصله میکروتیوب‌ها روی یخ منتقل شدند. در مرحله بعد سایر اجزای واکنش به میکروتیوب اضافه و حجم واکنش با آب به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط مورد نظر به‌مدت یک ساعت در دمای ٤٢ درجه سلسیوس قرارگرفت. به این ترتیب رشته مکمل (cDNA) ساخته شد. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر Primus (ساخت MWG آلمان) انجام گرفت.

واکنش PCR، در حجم ۵۰ میکرولیتری انجام شد. برای تهیه یک واکنش، ۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میکرولیتر از محلول $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر dNTP Mix با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (سیناکلون، ایران)، یک میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (معادل ۵ واحد)، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای بالادست (5'-ACATTTCTATCCTCCTCCAC-3') و پایین‌دست (غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، سه میکرولیتر از محصول cDNA با هم مخلوط و حجم آن توسط آب دوبار تقطیرسترون به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه این واکنش شامل یک مرحله ٩٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه هر یک مشتمل بر ۳۰ ثانیه در ٩٤ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه و ٤٥ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. در پایان واکنش محصول به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس قرار گرفت. به‌منظور بررسی نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پنج میکرولیتر از محصول این واکنش با سه میکرولیتر بافر نمونه مخلوط و در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید (به‌نسبت یک میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۸۰ ولت ثابت به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده و عکس‌برداری از قطعات دی.ان.ای تکثیر یافته طی واکنش پی.سی.آر با استفاده از دستگاه UV-illuminator مدل ایماکو (هلند) انجام گرفت.

ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها به بیماری ریزومانیا

بر اساس نتایج آزمون‌های الایزا و RT-PCR، نمونه خاک‌هایی که آلودگی به ریزومانیا در آن‌ها تأیید شده بود، انتخاب و پس از مخلوط شدن کامل، از آن در شرایط میکروپلات برای ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها استفاده شد. در سال دوم آزمایش ابتدا بذور شش ژنوتیپ منتخب چغندرقند که در شرایط میکروپلات نسبت به بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از *R. solani* مقاومت قابل توجه و بیشتری داشتند (شامل پنج هیبرید و یک ژنوتیپ شاهد)، داخل لیوان‌های پلاستیکی در خاک سترون کاشته و در شرایط گلخانه نگهداری و پس از رسیدن بوته‌ها به‌مرحله چهار برگی به میکروپلات منتقل شدند. این بوته‌ها پس از کاشت تحت مراقبت و آبیاری قرار گرفتند. برداشت ریشه‌ها در شهریور انجام شد و پس از ایجاد برش طولی در ریشه بر اساس روش (Luterbacher *et al*. 2005) که در این روش از مقیاس ۱ تا ۹ است به شرح زیر ارزیابی مقاومت به ریزومانیا صورت گرفت.

نمره ۱ گیاهان با ریشه های سالم (فاقد ریشه ریشی یا تغییر رنگ)

نمره ۳ ریشه‌های با ریشه‌ریشی محدود و قدری تغییر رنگ یافته

نمره ۵ ریشه‌های با ریشه‌ریشی متوسط و تغییر رنگ یافته

نمره ۷ ریشه‌های با ریشه‌ریشی شدید، نکروز و به شدت تغییر رنگ یافته .

نمره ۹ گیاهان مرده، ریشه های نکروز شده و پوسیده

نمرات زوج به بوته‌هایی که حد واسط نمرات فرد بودند داده شد. نحوه محاسبه شاخص بیماری(DI) و محاسبات آماری مشابه روش مشروح در مورد بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی بود. داده های به‌دست آمده از شاخص بیماری در قالب طرح بلوک های کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS-9.1 آنالیز شدند. همچنین پس از اتمام برداشت نمونه‌هایی از چغندرقند کشت شده در میکروپلات‌ها مورد بررسی سرولوژیکی و مولکولی ریزومانیا قرار گرفتند.

نتایج

مقاومت نسبت به پوسیدگی ریزوکتونیایی

بر اساس تجزیه داده‌های حاصل از مقایسه ژنوتیپ‌ها، بین این ژنوتیپ‌ها از نظر شدت علایم بیماری در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار بود. همچنین آزمون چند دامنه‌ای دانکن این ژنوتیپ‌ها را در گروه‌های مختلف قرار داد (جدول ۳). این ژنوتیپ‌ها شامل F-20680، S1-92298 *(7112*SB36)، S1-2153*(7112*SB36)، S1-92311 *(7112*SB36) و S1-92309 *(7112*SB36) بودند.

جدول۳- آزمون مقایسه‌ای دانکن در مورد دسته‌بندی ژنوتیپ‌های چغندرقند مورد آزمایش از نظر مقاومت نسبت به پوسیدگی ناشی از *Rhizoctonia solani* AG-2-2

Table 3. Duncan's comparative test regarding the classification of sugar beet genotypes for resistance to root rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2

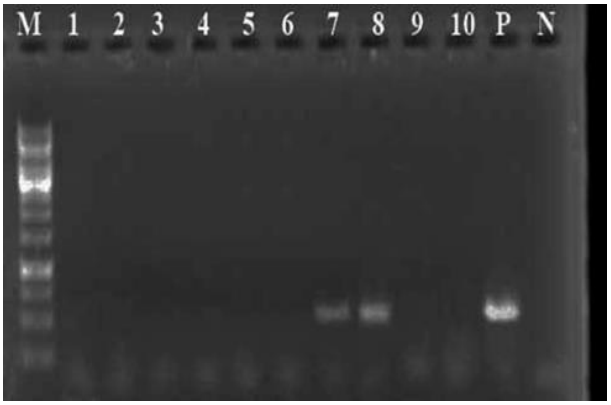
Treatment	Mean of disease index	Level
SBSI-4 control	6.2	a
(7112*SB36)* S1-2304	5.63	ab
(7112*SB36)*S1-92180	5.03	abc
(7112*SB36)*S1-92159	4.66	abc
(7112*SB36)*S1-92177	4.3	cde
(7112*SB36)*S1-92329	3.23	def
(7112*SB36)*S1-92176	2.73	ef
SBSI-3 control	1.83	ef
(7112*SB36)*S1-92156	1.56	ef
F-20707 control	1.5	ef
F-20680 control	1.4	f
(7112*SB36)*S1-92151	1.2	f
(7112*SB36)* S1-92304	1	f
(7112*SB36)* S1-92298	1	f
(7112*SB36)*S1-92153	1	f
(7112*SB36)* S1-92311	1	f

آزمون الایزا

نتایج حاصل از آزمون الایزا روی نمونه گیاهان کشت شده در ده کد نمونه خاک مورد بررسی در جدول ۲ نشان داد که دو نمونه MicroPlot و MAH-F دارای بیشترین میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر (وجود آلودگی بالا به BNYVV) بودند (جدول ٤). از مخلوط این نمونه خاک‌ها برای ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها در برابر بیماری ریزومانیا استفاده شد.

آزمون آر.تی- پی.سی.آر

با استفاده از روش آر.تی-پی.سی.آر و به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی برای بخشی از ژن پروتیین پوششی BNYVV، در آزمون ریشه گیاهان کشت شده در دو نمونه خاک MICROPLOT و MAH-F و شاهد مثبت یک قطعه دی.ان.ای به‌طول مورد انتظار حدود ۵۵۰ جفت باز تکثیر گردید (شکل ۱). در سایر نمونه‌ها قطعه دی.ان.ای مشاهده نشد که تأییدکننده نتایج حاصل از آزمون سرولوژیکی بود. در نمونه شاهد منفی (سالم) قطعه دی.ان.ای تکثیر نشد که نشان‌دهنده اختصاصی عمل نمودن واکنش می‌باشد.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR در ژل آگارز. ستون M: مارکر وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی (فرمنتاس، لیتوانی)، ستون‌های ۱ تا ۱۰: مربوط به گیاهان چغندرقند رشد داده شده در ۱۰ نمونه خاک مورد بررسی، ستون P: شاهد آلوده (مثبت) و ستون N: شاهد سالم (منفی). در گیاهان رشد داده شده در نمونه خاک‌های MICROPLAT و MAH-F (ستون‌های ۷ و ۸) و نیز در نمونه شاهد آلوده یک قطعه دی.ان.ای به‌طول تقریبی ۵۵۰ جفت باز تکثیر گردید.

Fig. 1. Electrophoresis of RT-PCR reaction products in agarose gel. Column M: 1 kilo base pair molecular weight marker (Fermentas, Lithuania), columns 1 to 10: related to sugar beet plants grown in 10 investigated soil samples, column P: infected control (positive) and column N: healthy control (negative). In the plants grown in microplat and MAH-F soil samples (columns 7 and 8) and in the infected control sample, a DNA fragment with an approximate length of 550 bp was amplified.

مقاومت نسبت به ریزومانیا

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از ارزیابی مقاومت نسبت به بیماری ریزومانیا، ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌دار نداشتند اما در آزمون مقایسه ای دانکن در سه گروه قرار گرفتند (جدول ۵). بر اساس نتایج این بخش از تحقیق ژنوتیپ F-20680 با سطح آماری a بیشترین شدت بیماری و هیبرید (7112*SB36)* S1-92309 با سطح آماری b کمترین شدت بیماری را نشان داد و چهار ژنوتیپ دیگر با سطح آماری ab بین آن‌ها قرار گرفتند. در آزمون الایزا برای بررسی آلودگی نمونه‌ها به ریزومانیا که پس از برداشت میکروپلات‌ها صورت گرفت آلودگی نمونه‌ها به ریزومانیا تأیید شد. در این آزمون، مقادیر جذب نوری چاهک‌های الایزا بین ۰/۶۹۲ (هیبرید (7112*SB36)* S1-92309) تا ۰/۸۵۱ (ژنوتیپ F-20680) متغیر بود.

جدول ٤- نقشه و میزان جذب نوری چاهک‌های بشقابک الایزا در ٤٠٥ نانومتر

Table 4. Map and absorbance of ELISA plate wells at 405 nm

Sample	Absorbance	Sample	Absorbance	Sample	Absorbance	Sample	Absorbance
KG-2	0.315	**SHV-k**	0.304	**MICROPLOT**	Out*	**SHV-1**	0.346
KG-2	0.327	**SHV-k**	0.180	**MICROPLOT**	Out*	**SHV-1**	0.332
SHA-9	0.310	**MAH-F**	0.940	**Blank**	0.154	**SHV-5**	0.269
SHA-9	0.303	**MAH-F**	1.413	**Blank**	0.158	**SHV-5**	0.268
SHA-1	0.254	**SHV-2**	0.296	**Healthy**	0.174	**KG-1**	0.300
SHA-1	0.262	**SHV-2**	0.290	**Healthy**	0.187	**KG-1**	0.314

*: میزان جذب نوری بیش از ۳ بوده است.

*: The amount of absorption was more than 3.

جدول ۵- آزمون مقایسه‌ای دانکن در مورد دسته‌بندی ژنوتیپ‌های منتخب چغندر قند مورد آزمایش از نظر مقاومت نسبت به بیماری ریزومانیا

Table 5. Duncan's comparative test regarding the classification of selected tested genotypes of sugar beet in terms of resistance to Rhizomania disease

Treatment	Mean of disease index	Level
F-20680	3.26	a
(7112*SB36)* S1-92298	2.86	ab
(7112*SB36)*S1-2153	2.18	ab
(7112*SB36)*S1-92151	2.06	ab
(7112*SB36)* S1-92311	2.06	ab
(7112*SB36)* S1-92309	1.76	b

بحث

بر اساس نتایج این تحقیق، ۱۲ هیبرید مورد بررسی درجات متفاوتی از آلودگی نسبت به *R. solani* را نشان دادند. نتایج مطالعات در آمریکا نشان داده که مقاومت در چغندرقند نسبت به ریزوکتونیا پلی‌ژنیک بوده و مشتمل بر حداقل دو جایگاه ژنی با دو یا سه آلل به همراه برخی ژن‌های تغییردهنده (modifier) است. قدرت توارث‌پذیری مقاومت به ریزوکتونیا در چغندرقند نسبتاً بالا و حدود ٦٥ درصد است (Hecker and Ruppel, 1975). مطالعات برخی محققین نشان داد که مقاومت به ریزوکتونیا غالبیت ناقص داشته و حداقل توسط دو ژن اصلی و چند ژن با اثرات متغیر کنترل می‌شود (Panella and Ruppel, 1996). با توجه به اینکه مقاومت در این بیماری توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شود، می‌توان انتظار داشت که در زمان ترکیب ژنوتیپ‌ها برای انتقال مقاومت، این انتقال به طور کامل انجام نشود و همواره احتمال عدم ظهور مقاومت کامل در هیبریدهای بدست‌آمده قابل انتظار است. لذا آزمون ژنوتیپ‌ها پس از عملیات تلاقی و بدست‌آوردن نتاج در شرایط کنترل‌شده میکروپلات ضروری است.

منبع مقاومت به ریزومانیا اولین بار در آمریکا یافت شد که توسط یک ژن غالب *Rz1* کنترل می‌شود (Lewellen *et al*., 1995; Scholten *et al*., 1997). با این وجود مقاومت ایجادشده توسط این ژن در ژنوتیپ‌های مختلف یکسان نبوده و عوامل متعددی بیان این ژن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. به طور مثال مقاومت

ایجاد شده توسط ژن مذکور در هیبریدهای دیپلوییدموثرتر از هیبریدهای تریپلوییدهست (Scholten *et al*., 1999). به این ترتیب تفاوتی که در بین ژنوتیپ‌های مقاوم مختلف نسبت به بیماری ریزومانیا مشاهده می‌شود، ممکن است به‌دلیل تفاوت ژنتیکی در میزبان باشد. در این بررسی تجزیه واریانس داده‌های شاخص بیماری در آزمایش مقاومت به ریزومانیا نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از نظر سطح مقاومت تفاوت معنی‌دار وجود ندارد، اما بر اساس آزمون دانکن ژنوتیپ‌ها در گروه‌های سه‌گانه دسته‌بندی شدند (جدول ۵). این تناقض به‌دلیل ویژگی آزمون دانکن است که می‌توان آن را در مواردی که F تیمارها معنی‌دار نیست بکار برد. در بسیاری از آزمایش‌ها میانگین‌های تیمارها در اطراف میانگین کل آزمایش به‌صورت قرینه‌ای قرار می‌گیرند. این‌که بین چند جفت میانگین از جمله کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین آن‌ها تفاوت بارزی مشاهده می‌شود، موجب کوچک شدن واریانس تیمار و در نتیجه معنی‌دار نبودن آن می‌گردد. در این موارد می‌توان با وجود معنی‌دار نبودن F تیمار، از آزمون دانکن که بر مبنای دامنه بین میانگین‌ها استوار است استفاده نمود (Yazdi Samadi *et al*., 2003). در تحقیق مخلص و همکاران (Mokhles *et al*., 2017) ژنوتیپ SBSI-4 بیشترین آلودگی ریشه به ریزومانیا و کمترین عملکرد ریشه را بخود اختصاص داد. در تحقیق حاضر نیز همین ژنوتیپ بیشترین آلودگی به قارچ *R. solani* را داشت و به‌همین دلیل در آزمایش مقاومت به ریزومانیا مورد بررسی قرار نگرفت. اما در آزمایش مخلص و همکاران ژنوتیپ F- 20680 کمترین میزان آلودگی به ریزومانیا و بیشترین عملکرد ریشه را از خود نشان داد در حالیکه در تحقیق حاضر این ژنوتیپ بالاترین میزان آلودگی به بیماری ریزومانیا نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی را داشت. همچنین ژنوتیپ S1-92309 *(7112*SB36) که در تحقیق حاضر کمترین میزان آلودگی به بیماری ریزومانیا را دارا بود در تحقیق مخلص و همکاران در گروه ژنوتیپ‌هایی با بیشترین میزان آلودگی به ریزومانیا و کمترین عملکرد ریشه دسته‌بندی شد. این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت ساختار ژنتیکی ویروس BNYVV در دو منطقه محل تحقیق باشد و نیاز به بررسی‌های گسترده‌تری دارد.

در آزمایش‌هایی که برای تعیین و تایید منبع خاک آلوده برای ارزیابی مقاومت به بیماری ریزومانیا روی ۱۰ نمونه خاک انجام شد، علایم مشخص بیماری ریشه‌ریشی در گیاهچه‌های کاشته‌شده در برخی نمونه خاک‌ها ظاهر شد، اما پس از انجام تست های الایزا و RT-PCR، آلودگی به BNYVV غیر از مزارع ایستگاه تحقیقاتی ماهیدشت و همچنین میکروپلات‌های آزمایشی آن ایستگاه، در سایر نمونه خاک‌های مورد بررسی تایید نشد. در آمریکا نتایج مطالعه روی ریشه‌های چغندر قند با علایم متوسط تا شدید ریشه‌ریشی نشان‌دهنده واکنش بسیار خفیف برخی از این نمونه‌ها با آنتی‌بادی اختصاصی BNYVV بود (Weiland *et al*., 2006). بررسی‌های تکمیلی انجام شده نشان‌دهنده آلودگی این نمونه‌ها با ویروس سوختگی سیاه چغندرقند (BBSV) *Beet black scorch virus* بود (Weiland *et al*., 2006). ویروس سوختگی سیاه چغندر از مناطق مختلف چغندرکاری‌های ایران از جمله کرمانشاه گزارش شده است (Mehrvar, 2009). ویروس BBSV یکی از ویروس‌های خاکزاد جدید گزارش شده از مزارع چغندرقند در دنیا است که به لحاظ داشتن علایم مشابه بیماری ریشه ریشی با ویروس BNYVV و احتمالا برخی برهمکنش‌های متقابل با این ویروس اهمیت اقتصادی بالایی دارد (Samiei *et al*., 2017) . به این ترتیب احتمال دارد در آن دسته از نمونه خاک‌های مورد بررسی که بوته‌های چغندرقند کشت شده در آن‌ها دارای علایم ریشه‌ریشی بودند ولی در آزمایش‌ها از نظر آلودگی به BNYVV منفی بودند، به ویروس(های) دیگری آلوده باشند. از این نظر بررسی‌های بیشتری برای تشخیص دقیق نوع ویروس(های) همراه با این نمونه خاک‌ها ضروری است.

نظر به اهمیت تولید لاین‌های مقاوم و کاهش خسارت ناشی از بیمارگرهای خاکزی چغندرقند، شرکت‌های تولید بذر در اروپا ارقام تجاری چغندرقند مقاوم به دو بیماری ویروسی ریزومانیا و پوسیدگی قارچی ریزوکتونیایی را تولید و به بازار

عرضه کرده‌اند که نتایج خوبی در مناطق آلوده به هر دو بیماری از خود نشان داده‌اند. همچنین در سال‌های اخیر بررسی و غربال ژنوتیپ‌های مختلف برای مقاومت نسبت به بیماری‌های ویروسی و قارچی در کشور و از جمله در استان‌های همدان و کرمانشاه شروع شده و نتایج به‌دست‌آمده بسیار امیدوارکننده است. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که ژنوتیپ هیبرید S1-92309 *(7112*SB36)* دارای کمترین آلودگی نسبت به دو بیماری ریزومانیا و پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه چغندرقند بوده و استفاده از والدین این هیبرید برای ادامه آزمایش‌های اصلاحی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه و بخش ویروس‌شناسی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به‌خاطر در اختیار گذاردن امکانات و وسایل تحقیق سپاسگزاری می‌کنند..

References

ABBASI MOGHADAM, A., M. FALAHATI RASTEGAR and B. JAFARPOUR. 1998. Etiology of sugar beet crown and root rot in Khorasan province. 13th Iranian Plant Protection Congress; 23–27 August; Isfahan, Iran.

AMIRI, R.,M. MOGHADAM, M. MESBAH, S.Y. SADEGHIAN and K. IZADPANAH. 2003. Genetic investigation of resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* sub sp. *maritima*, accession WB42. First joint IIRB-ASSBT congress, San Antonio, USA, 785-790.

BINACARDI, E.,R.T. LEWELLEN, M. DE BIAGGI, A.W. ERICHSEN, and P. STEVANATO. 2002. The origin of Rhizomania resistance in sugar beet. Euphytica. 127: 383-397.

BRUNT, A.A., K. CRABTREE, M.J. DALLWITZ, A.J. GIBBS and L. WATSON. 1996. Viruses of plants. Description and lists from the VIDE database. Wallingford, U.K., Center for Agricultural and Bioscience International.

BUTTNER, G., B. PFAHLER and B. MARALANDE. 2004. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to Rhizoctonia root and crown rot. Plant Breeding, 123: 158-166.

CLARK, M.F. and A.N. ADAMS. 1977. Adams. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses Journal of General Virology, 34: 474-483.

CORNELISON, B.J.C., M.P. DOED and L.S. MELCHER 1996. Strategies for molecular resistance breeding (transgenic plants). In: Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control, eds. Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S and Dijst G. pp. 529-536. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

DE BIAGGI, M., P. STEVANATO, D. TREBBI and M. SACCOMANI, 2010. Sugar Beet Resistance to Rhizomania: State of the Art and Perspectives. Sugar Technology, 12: 238-242.

EBRAHIMI KOULAEE, H., S.B. MAHMOUDI and M. HASSANI. 2010. Evaluation of the resistance of sugar beet breeding lines to Rhizoctonia root and crown rot. Journal of Sugar Beet, 26(1): 31-42. (In Persian with English summary)

HAMZEH H., M. HASSANI and H. MANSOURI. 2022. Screening of sugar beet o-type lines to Rhizoctonia root rot. Journal of Sugar Beet, (37)2: 153-165. (In Persian with English summary)

HARVESON, R.M. and C.M. RUSH. 1994. Evaluation of fumigation and Rhizomania tolerant cultivars for control of a root disease complex of sugar beets. Plant Disease, 78: 1197-1202.

HARVESON, R.M., C.L. HEIN, J.A. SMITH, R.G. WILSON, and C.D. YONTS. 2002. An integrated approach to cultivar evaluation and selection for improving sugar beet profitability. Plant Disease, 86: 192-204.

HASSANI, M, B. HEIDARI, S.B. MAHMOUDI, D. TALEGHANI and P. STEVANO. 2019. Identification of owen-type male sterility maintainers carrying resistance against Rhizoctonia Crown and Root Rot (Rcrr) disease in sugar beet germplasm. Sugar Tech. https://doi.org/10.1007/s12355-019-00733-w.

HECKER, R.J. and E.G. RUPPEL. 1975. Inheritance of resistance to Rhizoctonia root rot in sugar beet. Crop Science, 15: 487-490.

HECKER, R.J. and E.G. RUPPEL. 1976. Polyploid and maternal effects on Rhizoctonia root rot resistance in sugar beet. Euphytica, 25: 419-423.

IZADPANAH. K., P. HASHEMI, R. KAMRAN, M. PAKNIAT, A. SHANDPOUR and M. MASUMI. 1996. Widespread occurrence of Rhizomania-like disease of sugar beet in Fars. Iranian Journal of Plant Pathology, 32: 200-206. (In Persian with English summary).

KYA, R.,2009. Distrbution of Rhizomania disease in sugar beet growing areas of Turkey. Tarim Bilimleri Dergisi, 15: 332-340.

LEWELLEN, R.T. 1995. Performance of near-isolines of sugar beet with resistance to Rhizomania from different sources. Proc. IIRB Congress 58th, Brussels, Belgium. P. 83- 92.

LIU, Y., A. QI and M.F.R. KHAN. 2019. Age-Dependent Resistance to *Rhizoctonia solani* in Sugar Beet. Plant Disease, 103(9):2322-2329. doi: 10.1094/PDIS-11-18-2001-RE.

LUTERBUCHER, M.C., M.J.C. ASHER, W. BEYER, G. MANDOLINO, O.E. SCHOLTEN, L. FRESE, E. BIANCARDI, P. STEVANATO, W. MECHELKE and O. SLYVCHENKO. 2005. Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm: II. Soil-borne diseases. Euphytica, 141: 49-63.

MAHMOUDI, S.B., M. MESBAH and A. ALIZADEH, 2003. Evaluation of relative resistance in some selected sugar beet genotypes to Rhizoctonia root and crown rot. Iran. Journal of Crop Science, 5: 56-63. (In Persian with English summary)

MAHMOUDI, S.B., M. MESBAH and A. ALIZADEH, 2004. Pathogenic variability of sugar beet isolates of *Rhizoctonia solani*. Iranian Journal of Plant Pathology, 253- 280. (In Persian with English summary).

MAHMOUDI, S.B. 2007. Evaluation of sugar beet germplasm for resistance to Rhizoctonia root rot. Final report. Sugar Beet Seed Institute. 40 p. (In Persian with English summary).

MAHMOUDI S.B. and S. GHASHGHAIE. 2013. Reaction of sugar beet S_1 lines and cultivars to different isolates of *Macrophomina Phaseolina* and *Rhizoctonia Solani* AG-2-2-IIIB. Euphytica, 190: 439-445.

MAHMOUDI, S.B., P. NOROUZI, S. KHAYAMIM, M. BAZRAFSHAN, H. MASOURI, M. AHMADI, S. SADEGHZADEH HEMAYATI and M. AGHAEEZADEH. 2020. Identification of proper maternal parent for producing sugar beet cultivars resistant to major soil borne diseases. Journal of Sugar Beet, 36: 1-13. (In Persian with English summary)

MEHRVAR, M.A. 2009. Role for BBSV coat protein as symptom and avirulence determinant. In: Diversity of soil-borne sugar beet viruses in Iran. PhD. Thesis. Université catholique de Louvain Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale Unité de phytopathologie. 149 pp.

MESBAH, M., M.R. ORAZI ZADEH, A. RAJABI, and M. AGHAEE ZADEH. 2007. Introduction of the first Iranian Rhizomania resistant sugar beet monogerm hybrid variety (Zarghan). Journal of Sugar Beet, 23: 109-110. (In Persian with abstract in English)

MEUNIER, A., J.F. SCHMIT, A. STAS, N. KUTLUK and C. BRAGARD. 2003. Multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soil-borne virus*, and *Beet virus*

Q and their vector *Polymyxa betea* Keskin on sugar beet. Applied and Environmental Microbiology, 69: 2356-2360.

MOHAMMADIAN, R., A.R. GHAEMI, GH. R. ASHRAF MANSOURI, K. FOOTIHI, M.R. JAZAIREI NOSHABADI. 2017. Sugar beet hybrids response to Rhizomania disease in the infected fields. Journal of Sugar Beet, 33: 17-31. (In Persian with abstract in English)

MOKHLES, P., T. MIR-MAHMOUDI and K. FOUTOUHI. 2017. Evaluation of different genotypes of sugar beet to Rhizomania diseases in Miandoab conditions. Journal of Agronomy and Plant Breeding. 13: 1-13. (In Persian with abstract in English)

PANELLA, L.W. and E.G. RUPPEL. 1996. Availability of germplasm for resistance against *Rhizoctonia* spp. In: Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control, eds. Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S and Dijst G, pp.515-527. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

PANELLA, L.W. and E.G. RUPPEL. 1997. Registration of sugar beet germplasms FC721 and FC721 CMS resistant to Rhizoctonia root rot and moderately resistant to beet curly top virus. Crop Science, 37: 1675-1676.

PANELLA, L.W., E.G. RUPPEL. and R.J. HECHER. 1995. Registration of four multigerm sugar beet germplasms resistance to Rhizoctonia root rot FC716, FC717, FC718 and FC719. Crop Science, 35: 291-292.

POURRAHIM, R., H. AFZALI and M. KAKOEINEJAD. 2015. Survey of Beet necrotic yellow vein virus-BNYVV in sugar beet fields in five main provinces of Iran. Final Report. Iranian Research Institue for Plant Protection. 22 p. (In Persian with abstract in English)

RUSH, C.M. and G.B. HEIDEL. 1995. Furovirus diseases of sugar beets in United States. Plant Disease, 79: 868-875.

SAMIEI, A., M. MEHRVAR and M. ZAKIAGHL. 2017. Genetic diversity and distribution of Beet black scorch virus in Iran. Journal of Plant Protection, 540-547.

SCHOLTEN, O.E., R.M. KLEIN-LANKHORST, D.G. ESSELINK, T.S.M. DE BOCK and W. LANGE. 1997. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus in Beta accessions. Theoretical and Applied Genetics, 94:193-130.

SCHOLTEN, O.E. and T.S.M. DE BOCK, R.M. KLEIN-LANKHORST and W. LANGE. 1999. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. Theoretical and Applied Genetics, 99: 740-746.

SCHOLTEN, O.E. and W. LANGE. 2000. Breeding for resistance to Rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica, 112: 219-231.

SHEIKHOLESLAMI, M., H. YOUNESI and D. SAFAEI. 2005. Determination of fungi involved in sugar beet root rot and their distribution in Kermanshah province. Journal of Sugar Beet, 21: 99-100. (In Persian with abstract in English)

SNEH, B, S. JABAJI-HARE, S. NEATE and G. Djist. 1996. Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Chapter V (p247-404) and Chapter VIB (p. 445-559) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

TOSIC, M., D. SUTIC and M. MILAVONOVIC, 1985. Investigations of sugar-beet Rhizomania in Yugoslavia. Proceedings of 48th International Institute of Sugar Beet Research Winter Congress. Feb. 13-14; Bruxelles. 431-445.

UCHINO, H., H. WATANABE and K. KANZAWA. 1997. Controlling root diseases of sugar beet by applying Azoxystrobin. Proceedings of Japanese Society of Sugar Beet Technologists, 39: 73-79.

WEILAND, J.J., R.L. LARSON and T.P. FREEMAN. 2006. First Report of *Beet black scorch virus* in the United States. Plant Disease, 90: 828.

WINDELS, C.E. and D.J. NABBEN. 1989. Characterization and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolated from *Beta vulgaris*. Phytopathology, 79: 83-88.

YAZDI SAMADI, B., A. REZAEI and M. VALIZADEH. 2003. Statistical designs in agriculture research. University of Tehran press. 764p.

.

WISELER, G.C., H.Y. LIV and J.E. DUFFOS. 1994. Beet necrotic yellow vein virus and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. Plant Disease, 78: 995-1001.