ارزیابی مقاومت ارقام چغندرقند به نماتد سیستی در شرایط درون شیشه‌ای

Resistance evaluation of sugar beet cultivars to beet cyst nematode under *in vitro* conditions

راضیه قائمی[۱]، ابراهیم پورجم[۲*]، ناصر صفایی[۳]، سید باقر محمودی[۴] و رحیم مهرابی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۶

ر. قائمی، ا. پورجم، ن. صفایی، س.ب. محمودی و ر. مهرابی. ۱۳۹۷. ارزیابی مقاومت ارقام چغندرقند به نماتد سیستی در شرایط درون شیشه‌ای. **چغندرقند، ۳٤(۱): ٦٥- ۷٤.** DOI: 10.22092/jsb.2017.115911.1166

چکیده

این تحقیق با هدف بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای چغندرقند، امکان آلوده‌سازی آن با *Heterodera schachtii* و همچنین امکان شناسایی ارقام حساس و مقاوم به نماتد سیستی در محیط کشت گیاهی سترون در درون تشتک‌های پتری صورت گرفت. بدین منظور بذر رقم حساس جلگه و سه رقم مقاوم پائولتا، سانتا و نماکیل روی محیط آب-آگار کشت و پس از جوانه‌زنی به محیط اصلاح شده Knop منتقل شدند. دو هفته پس از جوانه‌زنی، ریشه‌های هر گیاه با ۲۰۰ عدد لارو سن دو *H. schachtii* مایه‌زنی شد و در روزهای اول، دوم، چهارم و هشتم پس از مایه‌زنی ریشه‌ها با اسید فوشین رنگ‌آمیزی و تعداد لارو درون ریشه‌ها شمارش گردید. ١٦ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی تعداد ماده‌های جوان تشکیل شده روی ریشه‌های هر گیاه نیز شمارش شدند. نتایج نشان دهنده بیشترین میزان نفوذ لارو سن دو در روز چهارم پس از مایه‌زنی و همچنین وجود اختلاف معنی‌دار در تعداد لارو سن دو بین ارقام حساس و مقاوم بود. بیست روز پس از مایه‌زنی به طور میانگین ۱۸/۷ ماده جوان روی ریشه‌های رقم حساس جلگه، ۵/۲ در رقم پائولتا، یک ماده جوان در رقم سانتا و ۱/۲ ماده جوان در رقم نماکیل مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل، می‌توان از روش مورد استفاده در این تحقیق به عنوان روشی آسان و دقیق جهت ارزیابی مقاومت به نماتد سیستی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: *Heterodera schachtii*، چغندرقند، محیط اصلاح شده Knop

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- استاد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. *-نویسنده مسئول pourjame@modares.ac.ir
۳- دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴- دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۵- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) گیاهی دو ساله، دگرگشن و دیپلوئید از تیره Amaranthaceae است که در اقلیم‌های معتدل و نیمه‌گرمسیری کشت می‌شود. این گیاه به همراه نیشکر منبع اصلی تأمین کننده قند در جهان می‌باشد. در ایران با توجه به شرایط آب و هوایی کشت نیشکر تنها در مناطق محدودی از کشور امکان پذیر است، در حالی‌که چغندرقند تقریباً در تمام مناطق ایران قابل کشت می‌باشد اما عوامل بیماریزای گیاهی از جمله نماتدها تولید این محصول را تحت تأثیر قرار داده و بخش قابل توجهی از کاهش عملکرد چغندرقند مربوط به این بیمارگرها می‌باشد.

خسارت سالانه نماتدهای انگل گیاهی به محصولات جهان ۱۵۷ بیلیون دلار برآورد شده است (Abad *et al*. 2008). نماتدهای سیستی از جمله مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی هستند که اهمیت اقتصادی زیادی در بسیاری از کشورهای جهان دارند. نماتد سیستی چغندرقند از سال ۱۸۵۹ با گزارش آلودگی چغندرقند در آلمان به عنوان یک بیمارگر گیاهی شناخته و در سال‌های بعد، این نماتد در نواحی کشت چغندرقند کشورهای اروپایی متعددی گزارش شد (Turner and Subbotin 2013). در حال حاضر، *Heterodera schachtii* از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای این محصول به شمار می‌رود و در اغلب مناطق چغندرکاری دنیا از جمله اروپا، آمریکای شمالی و آسیا وجود دارد (Draycott 2006). در ایران این نماتد اولین‌بار در سال ۱۳۴۸ از مزارع چغندرقند در خراسان گزارش شد (Esmailpour and 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 می‌شود. بیماری در سطح اندام‌های هوایی نیز موجب زردی و پژمردگی، کاهش و توقف رشد می‌گردد. برای مدیریت نماتد سیستی چغندرقند از روش‌هایی مانند تناوب زراعی با گیاهان غیرمیزبان، تغییر تاریخ کشت، ضدعفونی خاک با نماتدکش‌ها، کشت گیاهان تله و ارقام مقاوم چغندرقند استفاده می‌شود (Whitney and Duffus 1991; Zhang *et al*. 2008). با این وجود به دلیل پایداری طولانی مدت سیست‌ها در خاک، دامنه وسیع علف‌های هرز میزبان، افزایش مقاومت به کاربرد نماتدکش‌ها و خطرات زیست محیطی استفاده از این مواد شیمیایی، کنترل این نماتد روی چغندرقند بسیار دشوار است (Gardner and Caswell-Chen 1993). بدین منظور تولید ارقام مقاوم امری ضروری بوده و استفاده از ارقام مقاوم کارآمدترین، اقتصادی‌ترین و سالم‌ترین روش کاهش خسارت ناشی از نماتد می‌باشد. تولید ارقام مقاوم با استفاده از روش‌های سنتی به‌نژادی و روش‌های مدرن مهندسی ژنتیک و انتقال ژن صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه گونه زراعی چغندرقند فاقد ژن‌های مقاومت به نماتد سیستی است و تا کنون تنها چند ژن مقاومت در گونه‌های وحشی جنس *Beta* شناسایی شده است به‌نژادگران با تلاقی گونه‌های وحشی با چغندرقند سعی در انتقال ژن‌های مقاومت به چغندرقند نموده‌اند. از این رو هر ساله با تلاقی لاین‌های مختلف حامل منبع مقاومت به نماتد سیستی با یکدیگر لاین‌های جدیدی تولید شده که نیازمند ارزیابی از نظر مقاومت به نماتد سیستی در سطح گلخانه و سپس مزرعه می‌باشند.

مطالعات مختلفی در ارتباط با غربال مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند در ایران صورت گرفته است (Motieeian *et al*. 2016; Rahmani *et al*. 2013). طی یک مطالعه واحدی و همکاران (Vahedi *et al*. 2012) ۳۰ توده اصلاحی چغندرقند حاصل از تلاقی لاین‌های حامل دو منبع مقاومت را در سطح

مزرعه از نظر مقاومت به نماتد و عملکرد مورد مقایسه قرار داده و ژنوتیپ (MSR*W-1010)*231 را به عنوان ژنوتیپ مقاوم با عملکرد مناسب معرفی نمودند. طی مطالعه دیگری رحمانی و همکاران (Rahmani *et al*. 2009) مقاومت ۱۱ ژنوتیپ چغندرقند به نماتد سیستی را با مایه‌زنی ۱۰۰۰ لارو سن دو نماتد به ریشه‌های هر گیاه و شمارش تعداد سیست تشکیل شده در نه هفته پس از مایه‌زنی در شرایط گلخانه بررسی و بر اساس نتایج حاصل از آزمایش، ژنوتیپ‌ها را در سه گروه مقاوم، حساس و بسیار حساس گروه‌بندی نمودند.

با توجه به سختی و مشکلات ارزیابی تعداد زیاد ارقام در شرایط گلخانه‌ای برخی محققین سعی بر فراهم نمودن ساز و کار مناسب جهت بررسی مقاومت ارقام و همچنین انجام سایر آزمایش‌های مربوط به برهمکنش گیاه-نماتد در شرایط آزمایشگاهی نموده‌اند. در این رابطه، سایمونز و همکاران (Sijmons *et al*. 1991) به بررسی شرایط کشت آزمایشگاهی آرابیدوپسیس در برهمکنش با چند گونه نماتد مهم اقتصادی از جمله *H. schachtii* پرداخته و با استفاده از چند محیط کشت گیاهی و در تشتک‌های پتری امکان آلودگی و رشد و تکامل نماتد روی ریشه‌های گیاه آرابیدوپسیس را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات آن‌ها منجر به معرفی محیط اصلاح شده Knop (Knop 1860) به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت گیاهی به منظور انجام مطالعات مربوط به برهمکنش آرابیدوپسیس و *H. schachtii* شد. از آن زمان تا کنون محققین بسیاری در مطالعات مربوط به آرابیدوپسیس و نماتد سیستی چغندر از محیط کشت گیاهی Knop استفاده نموده‌اند (Baum *et al*. 2000; Szakasits *et al*. 2009; Hewezi *et al*. 2010; Ali *et al*. 2013, 2014;). با تکیه بر نتایج ارائه شده توسط سایمونز و همکاران (Sijmons *et al*. 1991) دستورالعملی به منظور ارزیابی آلودگی نماتد سیستی روی ریشه‌های آرابیدوپسیس با استفاده از محیط اصلاح شده Knop ارائه شده است (Bohlmann, and Wieczorek 2015). طی مطالعه‌ای شادمهر و همکاران (Shadmehr *et al*. 2008) با بررسی تیمارهای مختلف جهت سترون‌سازی سیست و لاروهای نماتد سیستی امکان کشت آزمایشگاهی دو رقم چغندرقند حساس به نماتد سیستی را در محیط کشت PG_{0B} حاوی هورمون بررسی کرده و ۴۰ روز پس از مایه‌زنی با ۳۰۰ لارو سن دو نماتد روی ریشه‌های هر گیاه تعداد پنج تا ۱۲ سیست را شمارش نمودند.

در مجموع با توجه به اهمیت چغندرقند در ایران و میزان بالای خسارت اقتصادی *H. schachtii* روی آن به عنوان میزبان اصلی، تولید ارقام مقاوم به نماتد از جمله مهم‌ترین راه‌کار مدیریتی این بیمارگر به شمار می‌رود. با وجود این، به دلیل مشکلات ارزیابی تعداد زیاد ارقام در شرایط گلخانه‌ای از جمله نیاز به فضای زیاد با دمای مناسب، نیاز به تعداد زیاد لارو سن دو برای مایه‌زنی با توجه به اندازه گلدان و حجم خاک مورد استفاده و همچنین زمان‌بر بودن شستشوی ریشه و خاک و شمارش تعداد نماتدها، غربال مقاومت در شرایط آزمایشگاهی روش جایگزین مناسبی محسوب می‌گردد. لذا هدف از انجام این تحقیق معرفی روشی آسان و مقرون به صرفه برای تشخیص ارقام مقاوم و حساس در شرایط درون شیشه‌ای بوده است که می‌توان از این روش در تحقیقات مربوط به برهمکنش چغندرقند-*H. schachtii* نیز استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

ارقام چغندرقند

به منظور بررسی نرخ نفوذ و رشد و تکامل نماتد روی ارقام مختلف مقاوم و حساس چغندرقند، بذر سه رقم تجاری

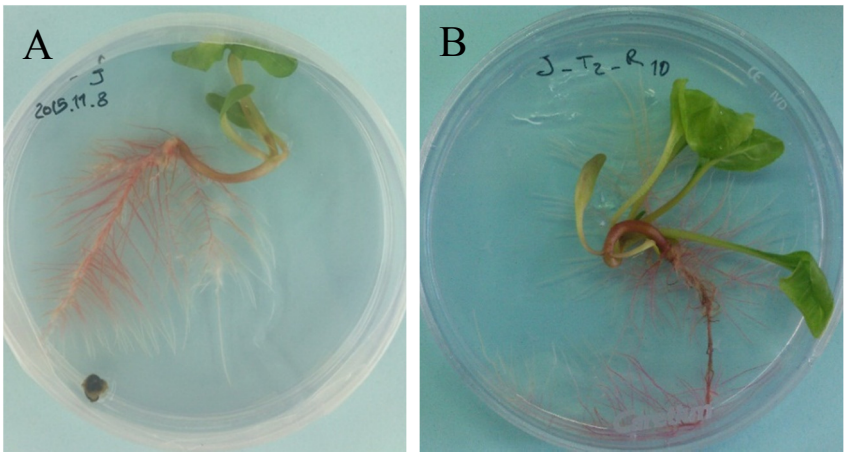
خارجی مقاوم به نام‌های سانتا، نماکیل و پائولتا (مقاومت جزئی) و رقم ایرانی حساس جلگه از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند تهیه شد. به منظور تسهیل در جوانه‌زنی، بذرهای چهار رقم چغندرقند درون فالکون‌های حاوی آب مقطر با دمای حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه الی چهار ساعت روی شیکر قرار داده شدند. سپس بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و پس از حذف اتانول، محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد اضافه و پس از ۱۵ دقیقه چهار تا پنج مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند و پس از خشک شدن روی کاغذ صافی سترون در تشتک‌های پتری حاوی آب-آگار کشت و در اتاقک رشد با شرایط تاریکی و دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

زادمایه نماتد

ریشه و خاک اطراف گیاهان چغندرقند آلوده به نماتد سیستی از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی سیست‌ها ریشه‌های همراه با خاک آلوده را داخل تشتک ریخته و پس از افزودن مقداری آب کاملاً مخلوط شدند و بعد از حدود ۲۰ ثانیه محلول رویی از الک‌های با قطر منافذ ۸۴۱ و ۲۵۰ میکرون عبور داده شد. سیست‌های جمع شده روی الک با منافذ ۲۵۰ میکرونی جهت انجام آزمایش جداسازی و به منظور تفریخ در محلول کلرید روی سه میلی‌مولار با شرایط تاریکی و دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. لاروهای آزاد شده از سیست‌ها با محلول ۰/۰۵ درصد کلرید جیوه به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و سپس سه تا پنج مرتبه با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شدند و برای مایه‌زنی به محلول ژلریت (Gelrite) ۰/۵ درصد منتقل شدند (Bohlmann and Wieczorek 2015).

کشت گیاهان روی محیط کشت Knop و مایه‌زنی نماتد

چهار روز پس از کشت بذرها در تشتک‌های پتری حاوی محیط آب-آگار، بذرهای جوانه زده به تشتک‌های پتری ۱۲ سانتی‌متری حاوی محیط Knop منتقل شدند و به منظور رشد سطحی ریشه‌ها و عدم نفوذ آن‌ها به درون محیط، تشتک‌های پتری به صورت نیمه عمودی در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱ چغندرقند رقم جلگه رشد یافته در محیط اصلاح شده Knop، A: قبل از مایه‌زنی و B: دو روز پس از مایه‌زنی با *Heterodera schachtii*

بـدین منظـور دسـتورالعمل «ارزیـابی آلـودگی نماتـدهای سیسـتی روی ریشـه‌هـای آرابیدوپسـیس (Bohlmann and Wieczorek 2015)» بـا انجـام تغییراتـی بـه شـرح زیـر مـورد استفاده قرار گرفت.

هر لیتر محیط Knop با استفاده از ۲۲ گرم ساکارز، هشت گـرم آگـار (Daishin agar, Duchefa Biochemie, the Netherlands)، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول پایه ویتـامین‌هـای B5، دو میلی‌لیتر محلول‌های پایه I تـا III، ۴۰۰ میکرولیتـر محلـول پایـه IV و ۲۰۰ میکرولیتر محلول پایـه V تهیـه شـد. بـه میـزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های نفتـالن اسـتیک اسـید (NAA) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) نیز استفاده شد.

دو هفته پس از جوانه‌زنی مجموع ریشه‌های هر گیاه بـا دو تا سه قطره ژلریت ۰/۵ درصـد کـه در مجمـوع حـاوی ۲۰۰ لارو نماتد سن دو سترون بودند مایه‌زنی شـدند. پـس از مایـه‌زنـی دور تشتک‌های پتری با پارافیلم بسته شد و بـه مـدت ۴۸ سـاعت بـه صورت افقی در اتاقک رشد قرار گرفتنـد و پـس از ایـن زمـان بـه منظور رشد سطحی ریشه‌ها، تشتک‌هـای پتـری بـه حالـت نیمـه عمودی اولیه قرار داده شدند.

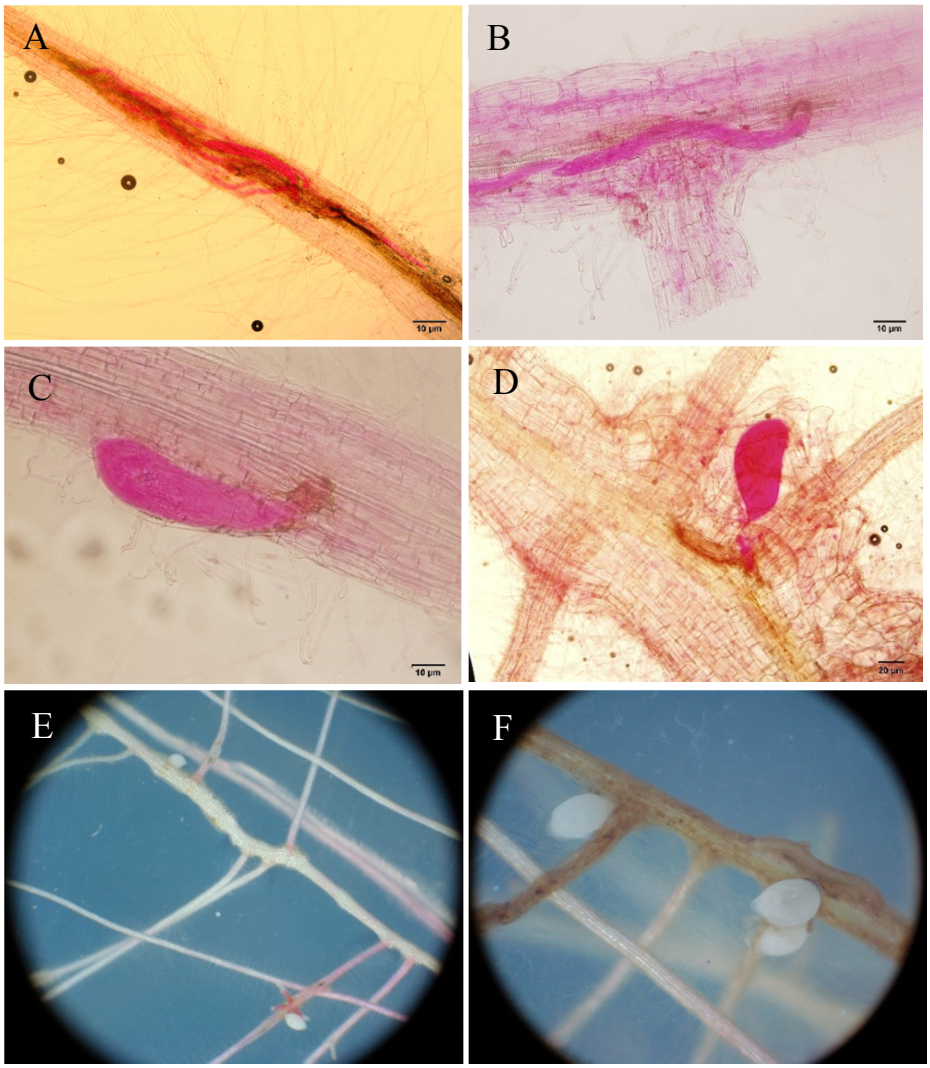
به منظور بررسی نرخ نفوذ و رشد و تکامل لاروهـای سـن دوم و سوم نماتـد در روزهـای اول، دوم، چهـام و هشـتم پـس از مایه‌زنی، در هر یک از زمان‌های ذکر شده ده گیاه از هـر رقـم بـه طور تصادفی جمع‌آوری و ریشه‌های آنها با استفاده از اسید فوشین ۰/۰۱۳ درصد رنگ‌آمیزی شـدند (Bybd *et al*. 1983) و پـس از یـک هفتـه، تعـداد نماتـدها در هـر گیـاه بـا اسـتفاده از استرئومیکروسـکوپ شـمارش و پـس از تهیـه اسـلایدهای میکروسکوپی عکسبرداری از نمونه‌ها بـا اسـتفاده از میکروسـکوپ نوری مدل Olympus BX51 و دوربین دیجیتال DP72 صورت گرفت. در روزهای ۱۶ و ۲۰ پس از مایه‌زنی نیز تعـداد مـاده‌هـای جوان سفید رنگ تشکیل شده روی ریشه‌های هـر گیـاه شـمارش شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی بـا ده تکـرار انجـام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افـزار SPSS نسـخه ۲۲ و مقایسه میانگین‌ها بـا آزمـون LSD در سـطح احتمـال پـنج درصد صورت گرفت.

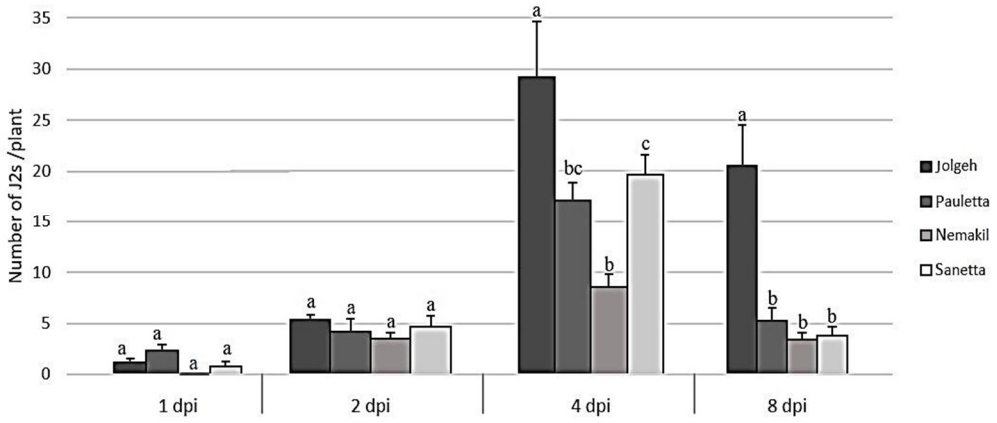
نتایج و بحث

رنگ‌آمیزی ریشه‌ها (شکل ۲) و شمارش لاروهای سن دو نماتد در روزهای اول و دوم بعد از مایه‌زنی نشـان داد تنهـا تعـداد بسیار کمی از لاروها موفق به نفوذ به داخل ریشه‌هـای هـر گیـاه شده‌اند و اختلاف معنی‌داری بین رقم حساس جلگه و ارقام مقـاوم نماکیل، سانتا و پائولتا وجود نداشـت ($P\geq0.05$). بیشـترین تعـداد لارو سن دو در روز چهارم پس از مایه‌زنی در رقم حسـاس جلگـه با میانگین ۲۹/۲ و در رقم مقاوم نماکیل کمترین تعـداد لارو سـن دو با میانگین ۸/۶ مشاهده شد. بین تعـداد لارو سـن دو نماتـد در رقم جلگه و سه رقم مقاوم و همچنین بین رقـم سـانتا و نماکیـل اختلاف معنی‌دار وجـود داشـت ($P\leq0.05$). در روز هشـتم پـس از مایه‌زنی نیز بین رقم جلگه با میانگین ۲۰/۵ و ارقام پائولتا، سـانتا و نماکیل به ترتیب با میانگین‌های ۵/۲، ۳/۸ و ۳/۴ لارو سـن دو در ریشه اختلاف معنی‌داری وجود داشـت امـا بـین سـه رقـم مقـاوم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۳).

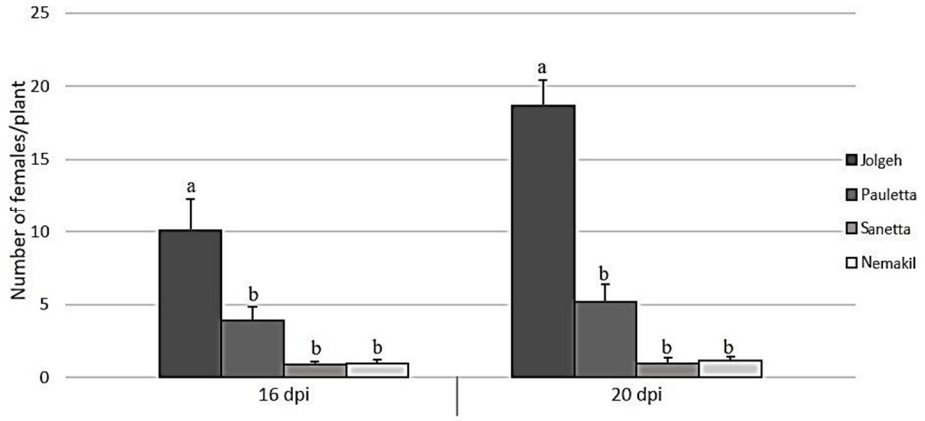


شکل ۲ لاروها و ماده‌های *Heterodera schachtii* در ریشه چغندرقند. A وB: لاروهای سن دو رنگ‌آمیزی شده درون ریشه چهار روز پس از مایه‌زنی، C: لارو سن سه رنگ‌آمیزی شده درون ریشه در روز هشتم پس از مایه‌زنی، D: لارو سن چهار مشاهده شده درون ریشه ۱۶ روز پس از مایه‌زنی، E و F: ماده‌های جوان تشکیل شده روی ریشه‌ها ۲۰ روز پس از مایه‌زنی

نتایج حاصل از شمارش ماده‌های جوان سفیدرنگ (شکل ۲) در روز شانزدهم نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین رقم حساس جلگه با میانگین ۱۰/۱ و ارقام مقاوم پائولتا، سانتا و نماکیل به ترتیب با میانگین‌های ۳/۹، ۰/۹ و یک بود. بیست روز پس از مایه‌زنی نیز روی ریشه‌های رقم جلگه ۱۸/۷، رقم پائولتا ۵/۲، رقم سانتا یک و رقم نماکیل ۱/۲ ماده جوان مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۳ تعداد لاروهای سن دوم (J2) در ریشه‌های چهار رقم چغندرقند در روزهای اول، دوم، چهارم و هشتم پس از مایه‌زنی (days post inoculation, dpi) با *Heterodera schachtii*. (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند P≥0.05)



شکل ٤ تعداد ماده‌های جوان در ریشه‌های چهار رقم چغندرقند در روزهای ۱۶ و ۲۰ پس از مایه‌زنی (days post inoculation, dpi) با *Heterodera schachtii*. (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P≥0.05)

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش مشخص شد که روز چهارم پس از مایه‌زنی بیشترین میزان نفوذ لارو سن دو نماتد به ریشه‌های چغندرقند صورت گرفته است. بنابراین در آزمایش‌های مربوط به مطالعه برهمکنش چغندرقند و نماتد سیستی آن می‌توان روز چهارم را به عنوان مهم‌ترین زمان نفوذ لارو سن دو نماتد در نظر گرفت.

بر اساس نتایج حاصل از شمارش ماده‌های جوان و با توجه به اینکه ۱۶ روز پس از مایه‌زنی تعداد کمی نماتد ماده سفیدرنگ روی ریشه‌های رقم حساس جلگه مشاهده شد به نظر می‌رسد بین دو زمان بررسی شده، روز ۲۰ زمان مناسب‌تری برای ارزیابی مقاومت و تشخیص و تمایز ارقام حساس و مقاوم مناسب‌تر می‌باشد. بنابراین با توجه به اینکه یکی از معیارهای ارزیابی مقاومت ارقام نسبت به *H. schachtii* تعداد سیست یا نماتد ماده سفیدرنگ تشکیل شده روی ریشه‌های گیاه می‌باشد (Baum *et al*. 2000; Müller *et al*. 1998)، می‌توان با کشت بذرهای ارقام موردنظر چغندرقند در محیط کشت اصلاح شده

Knop در درون تشتک‌های پتری و شمارش ماده‌های جوان در روز بیستم پس از مایه‌زنی نماتد ارقام حساس و مقاوم را از یکدیگر تشخیص داد. ذکر این نکته جالب توجه است که در محیط کشت Knop از آگار مخصوصی به نام Daishin استفاده می‌شود که ویژگی مهم آن شفافیت آن است، به همین دلیل بدون نیاز به شستشوی ریشه‌ها و بدون استفاده از استرئومیکروسکوپ به سادگی می‌توان ماده‌های جوان سفیدرنگ و یا سیست‌های قهوه‌ای تشکیل شده روی ریشه‌های گیاه را مشاهده و شمارش نمود.

طی مطالعه انجام شده توسط پائول و همکاران (Paul *et al*. 1987) کشت ریشه‌های مویین القاء شده با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* رقم Regina چغندرقند روی محیط MS (Murashige and Skoog) انجام و پس از تقریباً دو هفته نماتدهای نر و ماده روی ریشه‌ها مشاهده شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد اما در تحقیق حاضر نفوذ لاروهای سن دو نیز مورد بررسی قرار گرفته و روش ساده‌تری نیز در مقایسه با روش مورد استفاده توسط پائول و همکاران (Paul *et al*. 1987) به کار گرفته شده است. در تحقیق دیگری هیستوپاتولوژی و رشد و تکامل نماتد در یک رقم مقاوم چغندرقند آلوده با *H. schachtii* مورد بررسی قرار گرفته و به منظور نفوذ تعداد کافی لاروهای سن دو نماتد به مدت چهار روز در معرض ریشه‌های گیاه مقاوم قرار داده شدند که در تحقیق حاضر نیز روز چهارم به عنوان زمان مناسب برای ارزیابی نفوذ لارو سن دو نماتد به ریشه مشخص شد.

بسیاری از تحقیقات انجام شده روی نماتد سیستی چغندرقند در ارتباط با برهمکنش این نماتد با گیاه آرابیدوپسیس می‌باشد (Siddique *et al*. 2009; Szakasits *et al*. 2009; Hewezi *et al*. 2010; Ali *et al*. 2013)، از این‌رو پس از معرفی محیط اصلاح شده Knop در سال ۱۹۹۱ (Sijmons *et al*. 1991) بسیاری از مطالعات با استفاده از این محیط کشت انجام شده است. بائوم و همکاران (Baum *et al*. 2000) با استفاده از محیط اصلاح شده Knop و شمارش تعداد لارو سن دو و تعداد ماده‌های جوان در روزهای هفتم و پانزدهم پس از مایه‌زنی موفق به ارزیابی حساسیت ۵۲۰۰ گیاه جهش یافته آرابیدوپسیس به نماتد سیستی شدند. در تحقیق حاضر نیز با استفاده از محیط اصلاح شده Knop امکان ارزیابی حساسیت و مقاومت ارقام چغندرقند میسر شد. در تحقیق انجام شده توسط شادمهر و همکاران (Shadmehr *et al*. 2008) که با استفاده از محیط کشت PG_{0B} یک‌چهارم غلظت صورت گرفت با مایه‌زنی حدود ۳۰۰ لارو سن دو نماتد روی ریشه‌های هر گیاه تعداد پنج تا ۱۲ سیست را شمارش نمودند که با توجه به تعداد کم سیست تشکیل شده روی ریشه‌های ارقام حساس و در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد محیط اصلاح شده Knop محیط مناسب‌تری برای نماتد سیستی چغندر می‌باشد.

به طور کلی نتایج حاصل از تحقیقات سایر محققین نشان می‌دهد که محیط اصلاح شده Knop محیطی مناسب برای آرابیدوپسیس و *H. schachtii* است که نتایج این پژوهش نیز نشان دهنده این است که با انجام اصلاحاتی ساده می‌توان از این محیط برای انجام آزمایشات مربوط به برهمکنش چغندرقند و نماتد سیستی آن استفاده نمود و همچنین به سادگی درون تشتک‌های پتری و در محیط آزمایشگاهی مرحله اولیه ارزیابی مقاومت ارقام را انجام و ارقام حساس و مقاوم را از یکدیگر تفکیک نمود.

References: منابع مورد استفاده:

Abad P, Gouzy J, Aury JM, Castagnone-Sereno P, Danchin EGJ, Deleury E, Perfus-Barbeoch L, Anthouard V, Artiguenave F, Blok VC. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. Nature Biotechnology. 2008; 26(8): 909–915.

Ali MA, Abbas A, Kreil DP, Bohlmann H. Overexpression of the transcription factor *RAP2. 6* leads to enhanced callose deposition in syncytia and enhanced resistance against the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. BMC Plant Biology. 2013; 13(1): 47.

Ali MA, Wieczorek K, Kreil DP, Bohlmann H. The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* modulates the expression of WRKY transcription factors in syncytia to favour its development in Arabidopsis roots. PLoS one. 2014; 9(7): 1-17.

Baum TJ, Wubben MJE II, Hardy KA, Su H, Rodermel SR. A screen for *Arabidopsis thaliana* mutants with altered susceptibility to *Heterodera schachtii*. Journal of Nematology. 2000; 32: 166–173.

Bohlmann H, Wieczorek K. Infection assay of cyst nematodes on Arabidopsis roots. Bio-protocol. 2015; 5(18): e1596. http://www.bio-protocol.org/e1596.

Bybd DW, Kirkpatrick T, Barker KR. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology. 1983; 15(1): 142-143.

Draycott AP. Sugar Beet. Blackwell Publishing Co Ltd. UK. 2006; 514 p.

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

Gardner J, Caswell-Chen EP. Penetration, development, and reproduction of *Heterodera schachtii* on *Fagopyrum esculentum*, *Phacelia tanacetifolia*, *Raphanus sativus*, *Sinapis alba*, and *Brassica oleracea*. Journal of Nematology. 1993; 25(4): 695.

Hewezi T, Howe PJ, Maier TR, Hussey RS, Mitchum MG, Davis EL, Baum TJ. Arabidopsis spermidine synthase is targeted by an effector protein of the cyst nematode *Heterodera schachtii*. Plant Physiology. 2010; 152: 968–984.

Knop W. Ober die Ernahrung der Pflanzen durch wasserige L6sungen unter Ausschluss des Bodens. Landwirtsch. Versuchsstat. 1860; 2: 65-99 and 270-293.

Mahmoudi SB. 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. 2013; pp. 177-210. (in Persian)

Motieeian L, Zand Parsa Sh, Olia M. Screening of sugar beet genotypes to beet cyst nematode. Journal of Sugar Beet. 2016; 32(2): 107-121.

Müller J. New pathotypes of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) differentiated on alien genes for resistance in beet (*Beta vulgaris* L.). Fundamental and Applied Nematology. 1998; 21(5): 519-526.

Paul H, Zijistra C, Leeuwaugh JE, Krens FA, Huijing HJ. Reproduction of the beet cyst nematode Heterodera schachtii on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. Plant Cell Reports. 1987; 6: 379–381.

Rahmani N, Mesbah M, Norouzi P, Mahmoudi SB. Evaluation of resistance of some sugar beet genotypes to beet cyst nematode under greenhouse conditions. Journal of Sugar Beet. 2009; 25(1): 13-22. (in Persian, abstract in English)

Rahmani N, Mesbah M and Norouzi P. Identification of molecular markers linked to sugar beet cyst nematode resistance gene(s). Journal of Sugar Beet. 2013; 28(2): 81-85.

Shadmehr A, Norouzi P, Garosi G, Yavari N. Optimization of sterilizing method of larvae and cyst of *Heterodera schachtii* and the possibility of their application in sugar beet seedlings in *in vitro* condition. Journal of Water and Soil Science. 2008; 11(42): 237-247. (in Persian)

Siddique S, Endres S, Atkins JM, Szakasits D, Wieczorek K, Hofmann J, Blaukopf C, Urwin PE, Tenhaken R, Grundler FMW, Kreil DP, Bohlmann H. Myo-inositol oxygenase genes are involved in the development of syncytia induced by *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. New Phytologist. 2009; 184: 457–472.

Sijmons PC, Grundler FMW, Vonmende N, Burrows PR, Wyss U: *Arabidopsis thaliana* as a New Model Host for Plant-Parasitic Nematodes. Plant Journal. 1991; 1(2): 245–254.

Szakasits D, Heinen P, Wieczorek K, Hofmann J, Wagner F, Kreil D, Sykacek P, Grundler FMW and Bohlmann H. The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. Plant Journal. 2009; 57: 771–784.

Turner SJ, Subbotin SA. Cyst nematodes. In: Plant nematology. 2nd Eds. Perry RN and Moens M. CABI Publishing. Wallingford, Oxfordshire, England. 2013; pp. 109-143.

Vahedi S, Rajabi A, Mahmoudi B, Aghaie Zadeh M. Evaluation of Different Sugar Beet Populations for Resistance to Beet Cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schmidt). Journal of Plant Protection. 2012; 35(3): 31-43. (in Persian, abstract in English)

Whitney ED, Duffus JE. Compendium of Beet Diseases and Insects. American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 1991; 76 pp.

Zhang CL, Xu DC, Jiang X C, Zhou Y, Cui J, Zhang CX, Chen DF, Fowler MR, Elliott MC, Scott NW, Dewar AM, Slater A. Genetic approaches to sustainable pest management in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Annuals of Applied Biology. 2008; 152: 143–156.