

Development of a repulsion molecular marker linked to rhizoctonia resistance gene(s) in sugar beet

Peyman Norouzi^{1*}, Naimeh Tork², Mozhddeh Kakueinezhad¹, Seyed Bagher Mahmoudi¹, Mojdeh Maleki²
(Received: 8 May. 2024 ; Accepted: 9 Nov. 2024)

How to cite this article:

Norouzi P, Tork N, Kakueinezhad M, Mahmoudi S B, Maleki M. Development of a repulsion molecular marker linked to rhizoctonia resistance gene(s) in sugar beet. *Journal of Sugar Beet*. 2024; (40)1. 13-30. (In Persian with English abstract). Doi: <https://doi.org/10.22092/JSB.2024.365710.1360>

Extended abstract

Introduction

Root and crown rhizoctonia rot has been the most important fungal disease in sugar beet fields in the country. Therefore, the improvement of sugar beet varieties resistant to rhizoctonia is the most practical, safe and economical way to control this disease. Due to the fact that the classical evaluation methods of selection of resistance to this disease are phenotypic and depend on the environmental conditions and the uniformity of the inoculating agent and are carried out in a certain season of the year, hence, by using molecular methods, as a complementary or alternative method, it is possible to identify plants containing the resistance gene at the genotypic level. For genotypic screening of sugar beet breeding lines, molecular markers linked to resistance genes to rhizoctonia pathogen are needed. In this research, the aim was to develop and use a molecular marker linked to rhizoctonia resistance gene(s) in the genotypic screening of breeding materials of the Sugar Beet Seed Institute.

Materials and methods

In this research, the flanking sequences of a SNP molecular marker identified at the university of Padua, Italy were obtained and at the Sugar Beet Seed Institute, a pair of specific primers were designed and converted into a repulsion STS marker called SR2-r with normal PCR capability. This repulsion marker is able to identify homozygous resistant genotypes in the gene locus related to the marker. To check the reproducibility and confirm the repulsion marker SR2-r, firstly, several

population and breeding lines of the existing germplasm of the institute were cultivated in microplots or in the greenhouse at different times. Then, the developed roots were inoculated with corn seeds infested with *Rhizoctonia* pathogen. Leaf samples were prepared from the inoculated plants and kept in a freezer at -70°C until use. After a few weeks of inoculation, single roots were taken from microplates or pots and the disease score of rhizoctonia in each of the roots was recorded and the disease index of each genotype was estimated and then the genotypes were grouped. PCR molecular test was performed with the primers related to the repulsion marker in the DNA of susceptible and resistant plants and the presence and absence of the marker in single plants was determined. Statistical analysis for the disease index was done in a completely randomized design with unequal replications using SAS software (2013) and comparing of the data mean with the LSD test method. Then, the percentage of homozygote resistant plants in the SR2-r repulsion marker locus was obtained by dividing the number of plants without the susceptible allele band of the marker by the total number of molecular tested plants. In the next step, the relationship between the marker results and the rhizoctonia infection score was investigated as a pairwise comparison in all the tested plants and various quantitative traits and the repulsion marker error were calculated.

Results and discussion

The molecular marker SR2-r developed in this research, which is designed from the SNP marker sequence related to susceptibility to rhizoctonia, is of the repulsion type, which is able to identify the susceptible

1. Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*Corresponding author: norouzi1389@gmail.com

2. Plant Protection Department, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.



allele to rhizoctonia in one of the genetic loci of resistance to rhizoctonia. In the sense that the presence of a marker band of 285 bp in a plant sample indicates the susceptible genotype or the possible heterozygosity of that plant, and the absence of the marker indicates the absence of a susceptible allele or, in other words, homozygous resistance in the mentioned locus. The molecular test with the aforementioned repulsion marker in the single plants of each of the selected genotypes harvested from the greenhouse and the infected microplot field showed that this marker has polymorphism in most genotypes and its presence percentage and its agreement with the results of resistance evaluation in genotypes is variable. Due to the oligogenic nature of resistance to rhizoctonia, it cannot be expected that one hundred percent of the phenotypic diversity of the trait can be covered by using only one repulsion marker linked to one of the resistance gene loci. However, with the SR2-r marker, about 48% of resistant plants can be selected from a breeding population, which is considered a very high genotypic screening power for a marker. In the next step, the relationship between the results of repulsion molecular marker and the disease score was checked in the form of pairwise comparison in all the tested plants. The results indicated a 13% error between the molecular marker and phenotypic resistance in greenhouse or microplot conditions. In this research, for the first time, various quantitative criteria for the superiority of a single molecular marker are presented. When several unique molecular markers are developed for a trait, the best markers can be selected and used for molecular screening based on the results of the above criteria. In order to correctly evaluate the results of different methods of sugar beet breeding for resistance to rhizoctonia, it is necessary to correctly identify resistant plants. For this purpose, two methods of phenotypic and genotypic evaluation can be used, which in general, genotypic evaluation has more advantages than phenotypic evaluation of resistance, including the selection of resistant homozygotes using repulsion markers or co-dominant markers, keeping the tested plant healthy for next use, application of plants at each stage of growth, the independence of the tested plant from the season or environmental conditions, Keeping the greenhouse and field clean from rhizoctonia pathogens, requires less cages, isolation and observation tests to find a specific number of resistant lines. Also,

the presence percentage of the mentioned marker in a large number of pollinator lines, breeding populations, hybrids and susceptible and resistant commercial cultivars was investigated. According to the results of the molecular marker test in different genotypes, the percentage of presence of repulsion marker linked to rhizoctonia resistance gene(s) varied between zero and 100% and was mostly expected. The higher the proportion of susceptible plants in the primary population, the greater the selection gain with the help of the molecular marker in reducing the disease index. The overall agreement of the repulsion molecular marker with the rhizoctonia disease index in the greenhouse and microplot was 87%.

Conclusion

In this study, the reproducibility of a repulsion molecular marker (SR2-r) linked to rhizoctonia resistance genes, for which specific primer sequences were designed, was investigated. Thus, the overall agreement of the repulsion molecular marker with the rhizoctonia infection index in greenhouse and microplot was 87%. This repulsion marker was able to identify about 48% of rhizoctonia-resistant plants.

Key words: Disease, Molecular marker, Resistance evaluation, Rhizoctonia, Sugar beet.

References

- Buttner G, Pfähler B, Märlander B. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to Rhizoctonia root and crown rot. *Plant Breeding*, 2008; 123: 158-166. Doi:<https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00967.x>.
- Mahmoudi SB, Mesbah M, Alizadeh A. Pathogenesis variation of rhizoctonia solani isolates of sugar beet. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 2004; 40: 253-283. (in Persian).
- Scholten OE, Panella LW, De Bock TS, Lange W. A greenhouse test for screening sugar beet (*Beta vulgaris*) for resistance to Rhizoctonia solani. *European journal of plant pathology*, 2001; 107: 161-166.

توسعه یک نشانگر مولکولی ناجفت پیوسته به ژن (های) مقاومت به بیماری پوسیدگی[†] ریزوکتونایی چغندرقد

پیمان نوروزی^{۱*}، نعیمه ترک^۱، مژده کاکویی نژاد^۱، سید باقر محمودی^۱، مژده ملکی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۱۹

نوع مقاله: پژوهشی

DOI: 10.22092/JSB.2024.365710.1360

پ. نوروزی، ن. ترک، م. کاکویی نژاد، س.ب. محمودی و م. ملکی. توسعه یک نشانگر مولکولی ناجفت پیوسته به ژن (های) مقاومت به بیماری پوسیدگی ریزوکتونایی چغندرقد. چغندرقد ۴۰(۱): ۱۳-۳۰

چکیده

بیماری پوسیدگی ریزوکتونایی ریشه و طوقه مهم‌ترین بیماری قارچی در مزارع چغندرقد کشور بوده و مؤثرترین روش مدیریت این بیماری، اصلاح رقم‌های مقاوم به آن می‌باشد. برای غربال ژنوتیپی لاین‌های اصلاحی چغندرقد نیاز به نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن‌های مقاومت به عامل بیمارگر ریزوکتونیا است. در این تحقیق توالی‌های مجاور یک نشانگر مولکولی SNP شناسایی شده در دانشگاه پادوای ایتالیا دریافت و در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد، جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی و به یک نشانگر ناجفت STS موسوم به SR2-r با قابلیت PCR استاندارد تبدیل شد. این نشانگر ناجفت قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم خالص در جایگاه ژنی مرتبط با نشانگر می‌باشد. برای بررسی تکرارپذیری و تأیید نشانگر ناجفت SR2-r، ابتدا توده‌ها و لاین‌های اصلاحی متعددی از ژرم‌پلاسِم موجود مؤسسه در کرت‌های آزمایشی میکروپلات یا در گلخانه در زمان‌های مختلف کشت شدند. سپس ریشه‌های توسعه‌یافته با دانه‌های ذرت آغشته شده به بیمارگر ریزوکتونیا تلقیح شدند. نمونه‌های برگ‌ی از بوته‌های تلقیح شده تهیه و تا زمان استفاده در فریزر ۷۰°C- نگه‌داری شدند. پس از گذشت چند هفته از زمان تلقیح، تک ریشه‌ها از میکروپلات یا گلدان‌ها برداشت و نمره آلودگی به بیماری ریزوکتونیا در هر یک از ریشه‌ها یادداشت‌برداری و شاخص آلودگی هر ژنوتیپ برآورد و سپس ژنوتیپ‌ها گروه‌بندی شدند. در مرحله بعد، بوته‌های حساس و مقاوم انتخاب و از برگ‌های فریز شده آن‌ها استخراج DNA انجام گرفت. واکنش PCR با آغازگرهای مربوط به نشانگر ناجفت در DNA بوته‌های حساس و مقاوم انجام گرفت و حضور و عدم حضور نشانگر در تک بوته‌ها مشخص شد. در مرحله بعد، ارتباط بین نتایج نشانگر مولکولی ناجفت با نمره آلودگی به بیماری به صورت مقایسه جفتی در تمام بوته‌های آزمون شده بررسی شد. نتایج حاکی از توافق ۸۷ درصدی بین نشانگر مولکولی با مقاومت فنوتیپی در شرایط گلخانه یا میکروپلات بود. این نشانگر ناجفت قادر به شناسایی ۴۸ درصد از بوته‌های مقاوم به ریزوکتونیا بود، البته با توجه به حضور غیرقابل انتظار باندهای بسیار ضعیف در برخی ژنوتیپ‌های هموزیگوت مقاوم، پیشنهاد می‌گردد در صورت امکان از Real-time PCR نیز استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی مقاومت، بیماری، چغندرقد، ریزوکتونیا، نشانگر مولکولی

۱. دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

*- نویسنده مسئول: norouzi1389@gmail.com

۲. دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران.

۳. استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۴. استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران.

مقدمه

از بیماری‌های مهم و محدودکننده زراعت و تولید چغندرقد (*Beta vulgaris*)، پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه چغندرقد با عامل قارچی *Rhizoctonia solani* Kühn در کشور است که در مراحل مختلف رشد تهدید جدی برای این گیاه به حساب می‌آید. پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه از جمله بیماری‌های مراحل اولیه رشد محصول و پوسیدگی ریشه و طوقه و بلایت برگی در مراحل بعدی رشد چغندرقد هستند. در اثر پوسیدگی ریشه عملکرد، در صد قند و قابلیت سیلوپذیری ریشه‌های آلوده به شدت کاهش می‌یابد (Mahmoudi *et al.* 2004). محمودی و سلطانی (Mahmoudi and Soltani 2005). گزارش کردند که در میان عوامل مسبب پوسیدگی ریشه، سه نوع پوسیدگی ریزوکتونیایی، فیتوفتورایی و پیتیومی در ایران از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند. گستره پراکنش بیماری پوسیدگی ریشه مناطق چغندرکاری غرب کشور (استان‌های اردبیل، آذربایجان غربی، کرمانشاه، همدان و لرستان) و مناطقی از استان‌های خراسان شمالی و مرکزی را در بر گرفته است (Mahmoudi *et al.* 2004). پوسیدگی‌های ریشه ناشی از بیمارگر ریزوکتونیا مشتمل بر پوسیدگی ریشه و طوقه، پوسیدگی شانکر خشک ریشه و پوسیدگی بنفش ریشه می‌باشند که توسط گونه‌های مختلف ریزوکتونیا ایجاد می‌شوند (Herr 1996). در صورت وجود عوامل آفات و بیماری در مزرعه، کنترل شیمیایی باعث بهبود عملکرد می‌گردد، اما آلودگی زیست‌محیطی به همراه دارد ولی در استفاده از ارقام مقاوم ضمن افزایش عملکرد، آلودگی زیست‌محیطی نیز کاهش چشمگیری می‌یابد. از این رو، اصلاح رقم‌های چغندرقد مقاوم به ریزوکتونیا، کاربردی‌ترین، امن‌ترین و اقتصادی‌ترین راه کنترل این بیماری به شمار می‌آید (Sheikholeslam 2001, Panella and Ruppel 1996; Scholten *et al.* 2001).

ارقام مقاوم، ارقامی هستند که طی فصل زراعی در صرفه‌جویی زمان، سرمایه و انرژی به کشاورز کمک شایانی می‌کنند. هم‌اکنون ارقام تجاری مقاوم به بیماری در سطح وسیع در آمریکا و اروپا تولید شده است و در دسترس کشاورزان قرار

دارد. در داخل کشور نیز در سال ۱۳۹۸ دو رقم جدید هیبرید چغندرقد منورم موسوم به دنا و سینا توسط مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد معرفی شده‌اند که نسبت به بیماری ریزومانیا و پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه مقاومت دارند. بیمارگر ریزوکتونیا دارای ۱۴ گروه آناستوموزی است. در ایران عمدتاً گروه AG-2-2 عامل عمده پوسیدگی ریشه و طوقه در چغندرقد می‌باشد.

بر اساس یک نقشه پیوستگی نشانگرهای مولکولی، می‌توان ژن‌های مقاومت را مکان‌یابی کرد. مطالعه پیرامون مکان‌یابی یا نشان‌مند کردن ژن‌ها یا به عبارتی شناسایی یک نشانگر یا ژن پیوسته با ژن مورد نظر اطلاعاتی درباره‌ی تعداد ژن‌های کنترل‌کننده و موقعیت این ژن‌ها در نقشه پیوستگی ارائه می‌دهد. در حقیقت شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت یک عامل کلیدی برای تشخیص دقیق‌تر و بهتر صفت مقاومت و تعیین اثرهای متقابل بین میزبان و پاتوژن است. مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی نشان داده است که سه مکان کنترل‌کننده صفت کمی (QTL) بر روی کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۷ مجموعاً ۷۱ درصد تنوع فنوتیپی این صفت را پوشش می‌دهند (Lein *et al.* 2007, 2008). نظری (Nazari 2011) جهت ارزیابی و تجزیه ژنتیکی مقاومت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه از یک والد حساس به بیماری، F_1 ، F_2 و F_3 آن‌ها در شرایط میکروپلات در مزرعه استفاده کرد. سپس به منظور ترسیم نقشه ژنتیکی مقاومت از آغازگر AFLP، ISSR و STS روی جمعیت F_2 استفاده شد. با محاسبه شاخص بیماری (Disease Index) DI برای جمعیت F_3 که قبلاً در میکروپلات و در شرایط مزرعه کشت شده و با استفاده از گروه آناستوموزی AG2-2 که مهم‌ترین گروه آناستوموزی عامل پوسیدگی ریشه در چغندرقد می‌باشد، اطلاعات مقاومت به پوسیدگی ریشه خانواده‌های F_3 به دست آمد و در نهایت به کمک نرم‌افزار QTLcartographer، سعی شد QTL‌های دخیل در مقاومت شناسایی شود. در شرکت KWS آلمان برای مقاومت به بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه تاکنون تعداد پنج QTL (۲-۳ ژن اصلی و تعداد زیادی ژن

مولکولی از ۸۹ ژنوتیپ در قالب سه آزمایش بهره‌برداری گردید.

تهیه مایه تلقیح ریزوکتونیا: برای تهیه مایه تلقیح، چند دیسک از محیط کشت پنج روزه قارچ عامل بیماری از جدایه R. solani AG2-2 با قدرت بیماری‌زایی بالا (Rh133)، روی دانه‌های ذرت که ۱۲ ساعت در آب خیس شده و دو روز متوالی به مدت یک ساعت ضدعفونی شده بودند، قرار داده شد و به مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ارزیابی فنوتیپی مقاومت نسبت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه در شرایط گلخانه و میکروپلات مزرعه: برای ارزیابی مقاومت فنوتیپی به ریزوکتونیا، بذور ژنوتیپ‌های منتخب چغندر قند به همراه شاهد‌های مقاوم و حساس به بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی چغندر قند در شرایط گلخانه یا در شرایط مزرعه درون کرت‌های ایزوله تهیه شده در مزرعه موسوم به میکروپلات کاشته شدند. بوته‌های چغندر قند سه ماهه به‌طور مصنوعی مایه‌زنی شدند. برای این کار، شش بذر ذرت آغشته به بیمارگر ریزوکتونیا در پای هر بوته اطراف ریشه قرار داده شد (Windels *et al.* 1995). بلافاصله بعد از مایه‌زنی، خاک‌دهی پای بوته‌ها صورت پذیرفت و کرت‌ها تا دو هفته هر سه روز یک‌بار آبیاری شدند. یک ماه پس از مایه‌زنی، ریشه‌ها برداشت و شدت آلودگی هر ریشه بامقیاس یک تا نه (Buttner *et al.* 2008) سنجیده شد. در این مقیاس به ریشه‌هایی که هیچ‌گونه لکه بر روی آن‌ها مشاهده نشد، نمره یک و به ریشه‌های کاملاً پوسیده نمره نه داده شد. ریشه‌های با نمره یک تا سه به‌عنوان مقاوم، نمره چهار حد واسط و ریشه‌های با نمره پنج تا نه به‌عنوان حساس در نظر گرفته شدند. تعداد تکرارها برای هر ژنوتیپ از چهار تا ۱۰ بوته بستگی به موجودی بوته‌های مستقر شده طبق جدول دو متغیر بوده است.

تغییردهنده) شناسایی شده که روی نشانگرهای پیوسته با مقاومت به این بیماری در گلخانه کار می‌کنند (Rajabi and Aghaezadeh 2012). حسنی و همکاران (Hassani *et al.* 2018). چهار توالی SNP مرتبط با مقاومت به ریزوکتونیایی چغندر قند شناسایی کردند که مجموعاً ۴۳ درصد تنوع فنوتیپی مقاومت را پوشش داد. همچنین راوی و همکاران (Ravi *et al.* 2022) با غربال هزاران توالی SNP موفق شدند یک نشانگر SNP برای ژن مقاومت به ریزوکتونیا به دست آورند که حدود ۱۰ درصد تنوع فنوتیپی صفت را پوشش می‌دهد.

با توجه به آنکه روش‌های ارزیابی کلاسیک واکنش مقاومت به بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه از نوع فنوتیپی بوده و وابسته به شرایط محیطی و یکنواختی عامل آلوده‌کننده هستند و در فصل خاصی از سال انجام می‌گیرند و نیز بعضی گیاهان از عامل آلوده‌کننده به نحوی می‌گریزند و به‌ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این‌رو با استفاده از روش‌های مولکولی به‌عنوان روش تکمیلی و یا جایگزین می‌توان گیاهان دربردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی کرد (Norouzi *et al.* 2022). بنابراین، در این تحقیق هدف توسعه و به‌کارگیری یک نشانگر مولکولی پیوسته به ژن(های) مقاومت به ریزوکتونیا در غربال ژنوتیپی مواد اصلاحی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: ژنوتیپ‌های گوناگون چغندر قند با تنوع ژنتیکی وسیع به شرح مندرج در نتایج و بحث شامل لاین‌ها و توده‌های اصلاحی، والد‌های گرده‌افشان، هیبریدهای جدید مؤسسه و ارقام تجارتي مقاوم و حساس به ریزوکتونیا، جهت آزمون با نشانگر ناجفت پیوسته به ژن مقاومت به ریزوکتونیا بود. در مرحله آزمون نشانگر طراحی شده از دو توده در حال تفکیک برای ژن‌های مقاومت به ریزوکتونیا، در مرحله اعتبارسنجی نشانگر توسعه‌یافته از ۵۰ ژنوتیپ و در مرحله غربالگری

واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و سپس یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکمیل طول قطعات تکثیرشده در واکنش انجام شد. در مرحله بعد، الکتروفورز محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی رنگ اختصاصی اتیدیوم بروماید و مشاهده باند نشانگرناجفت در مستندساز ژل و حضور و عدم حضور نشانگر در تک بوته‌ها مشخص شد. به این ترتیب بوته‌های فاقد باند نشانگر ناجفت، به‌عنوان خالص مقاوم در جایگاه ژنی مربوط تعیین و تفکیک شدند.

محاسبات آماری: شاخص بیماری (DI) هر کرت از تقسیم حاصل‌ضرب هر نمره در تعداد ریشه (با آن نمره) بر تعداد کل ریشه‌های آن کرت محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری برای شاخص بیماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرارهای نامساوی با استفاده از نرم‌افزار SAS (2013) و مقایسه میانگین داده‌ها با روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) صورت گرفت. درصد بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه ژنی نشانگر ناجفت-SR2-T از تقسیم تعداد بوته‌های فاقد باند آلل حساس نشانگر به تعداد کل بوته‌های آزمون مولکولی شده حاصل شد و به‌صورت %A1A1 نمایش داده شد. در مرحله بعد ارتباط بین نتایج نشانگر با نمره آلودگی به ریزوکتونیا به‌صورت مقایسه جفتی در تمام بوته‌های آزمون شده بررسی و انواع صفات کمی و خطای نشانگر ناجفت محاسبه گردید. برای تعیین درصد توافق بین نتایج نشانگر مولکولی با نتایج ارزیابی در شرایط گلخانه و میکروپلات در هر ژنوتیپ از تقسیم تعداد بوته‌های هر ژنوتیپ که دارای توافق الگوی باند نشانگر با فنوتیپ مقاوم یا حساسیت بوته دارند به تعداد کل بوته‌های هر ژنوتیپ استفاده شد. همچنین تجزیه خوشه‌ای برای دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس سه صفت

طراحی آغازگرهای اختصاصی: توالی‌های مجاور یک نشانگر SNP مرتبط با مقاومت به ریزوکتونیا از دانشگاه پادوای ایتالیا دریافت (مذاکرات شخصی) و طراحی آغازگرهای اختصاصی ناجفت STS با روش‌های بیوانفورماتیکی در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقد انجام شد تا قابلیت انجام PCR استاندارد را با همان تکرارپذیری نشانگر SNP اولیه داشته باشد و نیازی به آزمون Real Time PCR نباشد. برای این منظور، ابتدا توالی‌های مجاور نشانگر SNP مذکور در ژنوم چغندرقد جستجو و حدود ۱۰۰۰ جفت باز از دو طرف توالی SNP انتخاب شد. توالی انتخاب‌شده در یک برنامه طراحی آغازگر موسوم به Oligo-5 وارد و آغازگر اختصاصی STS از توالی نشانگر SNP آلل حساس طراحی شد؛ به‌طوری که چندشکلی موجود در یک نوکلئوتید انتهایی آغازگر معکوس طراحی شده قادر به شناسایی آلل حساس یکی از ژن‌های مقاوم به ریزوکتونیا باشد. این نشانگر قادر به شناسایی آلل حساسیت بود و در نتیجه عدم حضور باند این نشانگر به‌منزله ژنوتیپ مقاوم خالص در یکی از جایگاه‌های ژنی پیوسته به ژن‌های مقاوم به ریزوکتونیا بود.

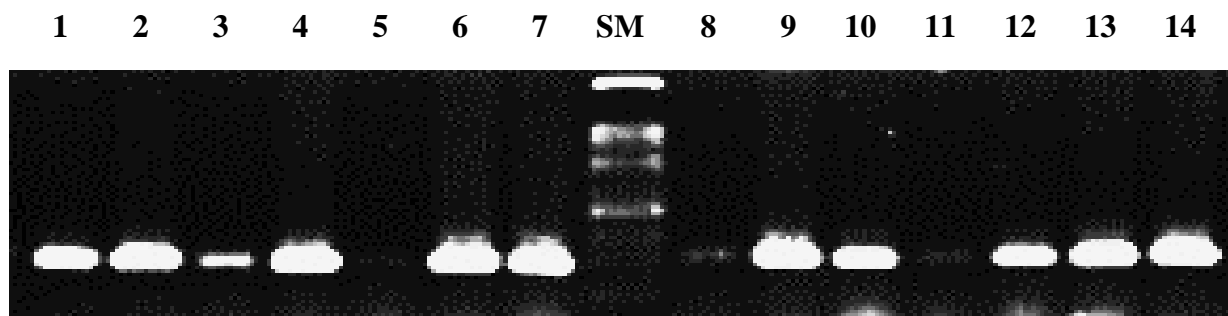
ارزیابی ژنوتیپی مقاوم به ریزوکتونیا با استفاده از نشانگر مولکولی: برای این کار ابتدا نمونه‌های برگ‌ی از گیاهان گل‌دانی یا میکروپلات تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از روش تغییریافته دلاپورتا (Dellaporta *et al.* 1983) انجام شد. سپس کمیت و کیفیت DNAهای استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین و جهت آزمون مولکولی غلظت DNAها به ۵۰ نانوگرم در لیتر با محلول تریس ۱۰ میلی‌مولار رقیق‌سازی شد. ارزیابی مولکولی مبتنی بر PCR با آغازگرهای اختصاصی STS مربوط به نشانگر SNP ناجفت پیوسته به ژن مقاوم به ریزوکتونیا طراحی شده در DNA بوته‌های حساس و مقاوم انجام گرفت. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر شامل پنج دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه هر چرخه شامل مرحله

نشان‌دهنده عدم وجود آلل حساسیت و یا به عبارتی خالص مقاوم بودن در جایگاه ژنی مذکور است (شکل ۱). به علت ماهیت ناجفت بودن نشانگر مذکور نمی‌توان بوت‌های حساس را از هتروزایگوت مقاوم به ریزوکتونیا تشخیص داد ولیکن می‌توان در توده‌های اصلاحی، بوت‌های خالص مقاوم احتمالی را با احتساب خطای نشانگر انتخاب و در مراحل بعدی اصلاحی برای اطمینان از مقاومت لاین‌های منتخب از روش‌های ارزیابی مقاومت فنوتیپی مانند گلخانه یا میکروپلات در مزرعه به‌عنوان روش‌های تکمیلی غربال مواد اصلاحی بهره‌برداری و به این ترتیب در زمان و هزینه‌های اصلاحی صرفه‌جویی کرد.

درصد آلودگی، شاخص بیماری و درصد بوت‌های خالص مقاوم انجام گرفت.

نتایج و بحث

نشانگر مولکولی SR2-r توسعه‌یافته در این تحقیق که از توالی نشانگر SNP حساسیت به ریزوکتونیا طراحی شده است از نوع ناجفت یا Repulsion است که قادر به شناسایی آلل حساس به ریزوکتونیا در یکی از جایگاه‌های ژنی مقاومت به ریزوکتونیا است. به این مفهوم که حضور باند ۲۸۵ جفت بازی نشانگر در یک نمونه گیاهی نشان‌دهنده‌ی ژنوتیپ حساس یا هتروزایگوت بودن احتمالی آن بوت‌هاست و عدم حضور نشانگر مذکور



شکل ۱ الگوی الکتروفورزی مربوط به نشانگر ناجفت SR2-r با اندازه باند ۲۸۵ جفت باز در تک بوت‌های یک توده در حال تفکیک برای ژن (های) مقاومت به ریزوکتونیا: ستون‌های ۱ تا ۴ و ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ تا ۱۴ مربوط به ۱۱ تک بوت‌های حامل نشانگر ناجفت با ژنوتیپ حساس یا هتروزایگوت احتمالی و ستون‌های ۵، ۸ و ۱۱ مربوط به سه تک بوت‌های فاقد نشانگر ناجفت با ژنوتیپ هموزیگوت مقاوم می‌باشند. SM: نشانگر تعیین اندازه DNA.

Fig 1. The electrophoresis pattern related to the marker SR2-r with a band size of 285 bp in individual plants from a population segregating of rhizoctonia resistance gene(s): columns 1 to 4, 6, 7, 9, 10 and 12 to 14 corresponding to 11 single plants with putative susceptible or heterozygous genotype and columns 5, 8 and 11 corresponding to three single plants with homozygous resistant genotype. SM: DNA size marker.

استفاده شد. این نشانگر ناجفت قادر بود حدود ۴۸ درصد بوت‌های مقاوم به ریزوکتونیا را شناسایی کند (جدول ۳). به علت ماهیت الیگوژنی بودن مقاومت به ریزوکتونیا نمی‌توان انتظار داشت که با استفاده از تنها یک نشانگر ناجفت پیوسته به یکی از جایگاه‌های ژنی مقاومت بتوان صد درصد تنوع فنوتیپی صفت مذکور را پوشش داد ولیکن با نشانگر SR2-r می‌توان حدود ۴۸ درصد بوت‌های مقاوم را از یک توده اصلاحی انتخاب کرد که برای یک نشانگر، قدرت غربالگری ژنوتیپی خیلی بالایی محسوب می‌شود (جدول ۳). حسنی و همکاران (Hassani

در این تحقیق، آغازگرهای یک نشانگر SNP پیوسته به ژن مقاومت به ریزوکتونیا از دانشگاه پادوا دریافت و با کمک روش‌های بیوانفورماتیکی، آغازگرهای اختصاصی STS طراحی شد تا بتوان با PCR استاندارد و بدون نیاز به Real Time PCR، آزمون مولکولی نشانگر SNP را که به نشانگر STS تبدیل شده انجام داد. نشانگر مولکولی توسعه یافته ناجفت STS پیوسته به یکی از ژن‌های مقاومت به ریزوکتونیا موسوم به SR2-r جهت بررسی تکرارپذیری آن در لاین‌ها، توده‌های اصلاحی، هیبریدها و ارقام تجارتمی مقاوم و حساس انتخاب و

بیماری یا همان نمره آلودگی به ریزوکتونیا اختلاف معنی داری وجود دارد. تجزیه واریانس صفت شاخص آلودگی در جدول یک آمده است. در جدول یک علی‌رغم ضریب تغییرات بالای آزمایش، اثر ژنوتیپ در سطح احتمال یک درصد معنی دار شده است زیرا تنوع داخل هر ژنوتیپ یا به عبارتی تک بوته‌های داخل هر ژنوتیپ نیز از نظر مقاومت و حساسیت به ریزوکتونیا در اکثر ژنوتیپ‌های در حال تفرق، زیاد بوده است.

(*et al.* 2018) چهار توالی SNP مرتبط با مقاومت به ریزوکتونیا چغندرقد شناسایی کردند که مجموعاً ۴۳ درصد تنوع فنوتیپی مقاومت را پوشش می‌داد. همچنین راوی و همکاران (Ravi *et al.* 2022) با غربال هزاران توالی SNP موفق شدند یک نشانگر SNP برای ژن مقاومت به ریزوکتونیا در چغندرقد به دست آورند که حدود ۱۰ درصد تنوع فنوتیپی صفت را پوشش داد. درخصوص ارزیابی فنوتیپی مقاومت در گلخانه نتایج نشان داد بین ژنوتیپ‌های آزمایشی از نظر شاخص

جدول ۱ نتایج تجزیه واریانس صفت شاخص بیماری ژنوتیپ‌های مورد بررسی

Table 1. Analysis of variance results for disease index of investigated genotypes

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
SOV	df	MS
ژنوتیپ	49	30.86**
Genotype		
خطا	276	4.95
Error		
ضریب تغییرات		47.61
CV %		

** اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد

** Significantly different at 1% probability level

مرحله اول به‌عنوان هموزیگوت مقاوم احتمالی در نظر گرفت و نمونه‌های منتخب بر اساس نشانگر مولکولی در مرحله بعد در طی ارزیابی‌های فنوتیپی در گلخانه یا میکروپلات با ریزوکتونیا آلودگی مصنوعی شده و مقاومت یا حساسیت واقعی آن‌ها مشخص شود؛ بنابراین در عین حال که یک نشانگر مولکولی با درصدی از خطاهای مختلف می‌تواند مواجه باشد ولیکن با داشتن درصد توافق مناسب با مقاومت به ریزوکتونیا همچون ۸۷ درصد در این تحقیق، نشانگر Sr2-r توسعه یافته توانسته است برای نخستین بار در غربال مولکولی جمعیت‌های اصلاحی چغندرقد در سه سال اخیر به‌صورت عملیاتی و کاربردی در مؤسسه تحقیقات چغندرقد بهره‌برداری سودمند و اقتصادی داشته باشد و حجم ارزیابی‌های فنوتیپی در گلخانه و میکروپلات را به‌شدت کاهش دهد.

ارزیابی مولکولی با نشانگر ناجفت مذکور در تک بوته‌های هر یک از ژنوتیپ‌های منتخب برداشت‌شده از گلخانه و میکروپلات (جدول ۲) نشان داد که این نشانگر در اکثر ژنوتیپ‌ها دارای چندشکلی بوده و درصد حضور و توافق آن با نتایج ارزیابی مقاومت در ژنوتیپ‌های مختلف متغیر می‌باشد. در جدول دو در بین ۵۰ ژنوتیپ آزمایشی از نظر درصد توافق نمره بیماری با نتایج نشانگر مولکولی، بین حدود ۲۰ تا ۱۰۰ درصد توافق وجود دارد. عدم مشاهده باند نشانگر ناجفت در این تحقیق یا همان عدم مشاهده نشانگر آلل حساس نشان‌دهنده بوته مقاوم هموزیگوت با ژنوتیپ A1A1 می‌باشد که در محاسبات درصد توافق و سایر شاخص‌ها به کار رفته است. البته در برخی موارد باندهای بسیار ضعیف نیز ممکن بود که تشکیل شود. در آزمون‌های غربال مولکولی ژرم‌پلاسم مؤسسه با استفاده از نشانگر ناجفت مذکور اگر باند بسیار ضعیف نشانگر تولید شود می‌توان آن بوته را در

جدول ۲ مقایسه ارزیابی واکنش مقاومت به ریزوکتونیا در شرایط گلخانه یا میکروپلات با آزمون مولکولی نشانگر ناچفت SR2-r در آزمایشگاه

Table 2. Comparing of evaluation of rhizoctonia resistance in greenhouse or microplot with molecular test of repulsion SR2-r in the lab

ردیف	محل ارزیابی مقاومت	ژنوتیپ	تعداد کل ریشه	تعداد ریشه آلوده	درصد آلودگی	شاخص بیماری	درصد ژنوتیپ هموزیگوت مقاوم	درصد توافق نشانگر ناچفت با نمره بیماری
Row	Resistance evaluation place	Genotype	Total plants	Infested root number	Infection %	Disease index	A1A1%	Agreement percent of marker and disease score
1	گلخانه	980039	8	4	50.00	5.00	0.00	100.00
2	گلخانه	980042	8	6	75.00	5.38	50.00	50.00
3	گلخانه	970044	7	0	0.00	1.00	42.86	100.00
4	گلخانه	970045	4	0	0.00	1.50	25.00	100.00
5	گلخانه	970073	6	1	16.67	2.33	83.33	100.00
6	گلخانه	970100	5	2	40.00	4.00	80.00	80.00
7	گلخانه	24P107	8	1	12.50	1.88	37.50	100.00
8	گلخانه	970127	5	2	40.00	3.60	40.00	100.00
9	گلخانه	970133	6	5	83.33	5.33	66.67	33.33
10	گلخانه	35173	8	5	62.50	5.13	25.00	87.50
11	گلخانه	35174	6	1	16.67	2.33	16.67	100.00
12	گلخانه	35175	7	3	42.86	3.71	57.14	71.43
13	گلخانه	35186	8	4	50.00	4.38	37.50	87.50
14	گلخانه	35190	7	3	42.86	3.14	28.57	100.00
15	گلخانه	35194	6	2	33.33	2.67	50.00	100.00
16	گلخانه	35203	5	1	20.00	2.40	40.00	80.00
17	گلخانه	35299	6	4	66.67	4.67	33.33	83.33
18	گلخانه	35304	9	5	55.56	6.22	22.22	77.78
19	گلخانه	35305	4	3	75.00	5.00	50.00	75.00
20	گلخانه	35309	4	2	50.00	4.50	50.00	75.00
21	گلخانه	35314	6	3	50.00	4.00	66.67	83.33
22	گلخانه	35326	6	2	33.33	2.50	66.67	100.00
23	گلخانه	35328	8	0	0.00	1.38	25.00	100.00
24	گلخانه	35343	4	2	50.00	4.00	50.00	50.00
25	گلخانه	34353	7	1	14.29	1.86	0.00	100.00
26	گلخانه	33627	4	1	25.00	2.50	50.00	75.00
27	گلخانه	FC709	6	2	33.33	2.83	66.67	100.00
28	گلخانه	Dena	8	5	62.50	4.75	25.00	100.00
29	گلخانه	Sina	8	2	25.00	2.13	50.00	87.50
30	گلخانه	Sharif	8	8	100.00	7.88	12.50	87.50
31	میکروپلات	SHR01-P.17	4	0	0.00	1.00	50.00	100.00
32	میکروپلات	SHR02-P.4	3	1	33.33	3.00	0.00	100.00
33	میکروپلات	S1-24	4	1	25.00	2.00	50.00	100.00
34	میکروپلات	SC-MH070	6	2	33.33	2.67	83.33	66.67
35	گلخانه	S1-92210	8	8	100.00	6.00	12.50	87.50
36	گلخانه	S1-92354	9	9	100.00	8.33	0.00	100.00
37	گلخانه	S1-92359	4	4	100.00	7.25	0.00	100.00
38	گلخانه	S1-92363	10	10	100.00	8.40	0.00	100.00
39	گلخانه	S1-92409	9	9	100.00	6.00	0.00	100.00
40	گلخانه	S1-92411	7	7	100.00	7.57	14.29	85.71

ادامه جدول ۲

41	گلخانه Greenhouse	S1-92419	5	5	100.00	7.00	0.00	100.00
42	گلخانه Greenhouse	S1-92421	10	10	100.00	8.00	0.00	100.00
43	گلخانه Greenhouse	S1-92424	10	10	100.00	7.00	0.00	100.00
44	گلخانه Greenhouse	S1-92435	7	7	100.00	8.00	0.00	100.00
45	گلخانه Greenhouse	S1-92447	7	6	85.71	5.00	0.00	100.00
46	گلخانه Greenhouse	S1-930006	5	4	80.00	4.80	60.00	60.00
47	گلخانه Greenhouse	S1-930014	6	6	100.00	5.67	50.00	50.00
48	گلخانه Greenhouse	S1-930026	5	5	100.00	6.00	80.00	20.00
49	گلخانه Greenhouse	S1-930035	8	7	87.50	6.00	25.00	75.00
50	گلخانه Greenhouse	S1-930036	7	3	42.86	4.00	71.43	57.14
	LSD 5%					2.53		86.81

جدول ۳ معیارهای کمی متصور برای نشانگر مولکولی ناچفت SR2-r بر اساس داده‌های جدول دو

Table 3. Quantitative criteria for SR2-r repulsion molecular marker based on data in table two

ردیف Row	معیارهای کمی برای نشانگر ناچفت Quantitative criteria for repulsion marker	مقدار محاسبه شده Calculated.value	دامنه مورد انتظار Expected.range	برتری معیار Superiority of the Criteria
1	میانگین نمره آلودگی عدم باندهای حساس و مقاوم Average disease score of the absence of susceptible and resistant bands	3.25	1 to 9	هر چه کمتر بهتر The less the better
2	میانگین نمره آلودگی عدم باندهای حساس Average disease score of the absence of susceptible bands	6.10	5 to 9	هر چه کمتر بهتر The less the better
3	میانگین نمره آلودگی عدم باندهای مقاوم Average disease score of the absence of resistant bands	1.38	1 to 3	هر چه کمتر بهتر The less the better
4	درصد نشانگرهای عدم باند مقاوم (دقت گزینش) Percentage of markers of the absence of resistant band	60%	0 to 100%	هر چه بیشتر بهتر The more the better
5	درصد نشانگرهای عدم باند حساس Percentage of markers of the absence of susceptible band	40%	0 to 100%	هر چه کمتر بهتر The less the better
6	درصد بوته‌های مقاومی که با نشانگر ناچفت قابل شناسایی هستند Percentage of resistant plants that can be identified with the repulsion marker	48%	0 to 100%	هر چه بیشتر بهتر The more the better
7	درصد بوته‌های حساسی که با نشانگر، مقاوم خالص تلقی می‌شوند Percentage of susceptible plants that are considered homozygous resistant by the marker	21%	0 to 100%	هر چه کمتر بهتر The less the better
8	خطای نشانگر ناچفت (درصد حساس‌های فاقد باند نشانگر به کل بوته‌ها) Repulsion marker error (percentage of susceptibles without marker bands to total plants)	13%	0 to 100%	هر چه کمتر بهتر The less the better
9	درصد توافق نشانگر با نمره آلودگی Percentage of agreement of the marker with the disease score	87%	0 to 100%	هر چه بیشتر بهتر The more the better
10	درصد نشانگرهای حضور باند حساس Percentage of markers with susceptible band presence	69%	0 to 100%	بستگی به فراوانی بوته‌های حساس Depends on the abundance of
11	درصد نشانگرهای حضور باند مقاوم Percentage of markers with resistant band presence	31%	0 to 100%	بستگی به فراوانی بوته‌های مقاوم Depends on the abundance of resistant plants
12	میانگین نمره آلودگی حضور باندهای حساس Average disease score of the presence of susceptible bands	7.09	5 to 9	هر چه بیشتر بهتر The more the better
13	میانگین نمره آلودگی حضور باندهای مقاوم Average disease score of the presence of resistant bands	1.37	1 to 3	هر چه کمتر بهتر The less the better
14	میانگین نمره آلودگی حضور باندهای حساس و مقاوم Average disease score of the presence of susceptible and resistant bands	5.34	1 to 9	بستگی به نسبت بوته حساس و مقاوم Depends on the ratio of susceptible and resistant plants

به بیماری ریزومانیبا با استفاده از داده‌های یک نشانگر ناجفت و مقادیر جذب الایزا در یک توده F_2 توانستند ژنوتیپ‌های خالص غالب را از هتروزیگوت تفکیک نمایند و میانگین جذب الایزای مشابهی برای این دو ژنوتیپ به دست آورند. ایشان نتیجه گرفتند که دز ژن RZ_1 تأثیری در میزان مقاومت به ریزومانیبا ندارد در حالیکه نوروزی و همکاران (Norouzi *et al.* 2013, 2015) از یک نشانگر ناجفت دیگر برای بررسی اثر دز ژن مقاومت به ریزومانیبا استفاده نمودند و نتیجه گرفتند که ژنوتیپ‌های خالص غالب نسبت به هتروزیگوت‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. نظری (Nazari, 2011) از یک جمعیت F_2 حاصل تلاقی بین لاین مقاوم به ریزوکتونیا 2-709-FC و لاین حساس ۲۳۱ برای مکان‌یابی ژنتیکی با کمک نشانگرهای AFLP، ISSR و STS استفاده کرد. از بین ۷۵ نشانگر حاصل تنها یک نشانگر AFLP با کمترین فاصله به آلل مقاومت و در حدود ۱۹/۲ سانتی مورگان شناسایی شد. به عبارتی خطای نوع اول نشانگر مذکور حدود ۱۹ درصد بود.

در جدول سه، توافق کلی نشانگر با نمره بیماری ۸۷ درصد و خطای کلی نشانگر ۱۳ درصد برآورد شده است. در این تحقیق برای نخستین بار معیارهای کمی مختلفی برای برتری یک نشانگر مولکولی ناجفت ارائه می‌شود. در زمانی که چندین نشانگر مولکولی ناجفت برای یک صفت توسعه یابد می‌توان بر اساس ملاحظه و برآیند معیارهای ۱۴ گانه جدول سه، برترین نشانگرها را برای غربال‌های مولکولی انتخاب و بهره‌برداری کرد. در نشانگرهای ناجفت به علت ماهیت نشانگر که فقط باند آلل حساس را تکثیر می‌کند برای تعیین میزان خطای نشانگر فقط بوته‌های حساس فاقد باند نشانگر دخالت دارند زیرا آلل حساس در هتروزیگوت‌ها نیز وجود دارد ولیکن به سبب ماهیت نشانگرهای ناجفت نمی‌توان بوته‌های حساس را از ناخالص مقاوم تشخیص داد. طبق جدول ۳، مشابهت مقادیر میانگین نمره آلودگی صفرهای مقاوم (۱/۳۸) با میانگین نمره آلودگی یک‌های مقاوم (۱/۳۷) نشان‌دهنده‌ی عدم تأثیر دز ژن پیوسته با نشانگر ناجفت مذکور است. نوحی و همکاران (Nouhi *et al.* 2009) در تحقیقی مرتبط با نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن مقاومت

جدول ۴ عکس‌العمل گزینش با کمک نشانگر مولکولی ناجفت SR2-r در کاهش میانگین نمره آلودگی چندرقتند در مجموع ارزیابی‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای میکروپلات

Table 4. Selection response using repulsion molecular marker SR2-r in reducing the average infection score of sugar beet in total greenhouse and field microplot evaluations

ردیف Row	وضعیت‌های مختلف نشانگر ناجفت Different statuses of repulsion marker	تعداد بوته Plant number	شاخص بیماری ریزوکتونیا Rhizoctonia disease index	میزان کاهش شاخص بیماری در اثر انتخاب بوته‌های فاقد باند نشانگر ناجفت (در اثر انتخاب بوته‌های خالص مقاوم احتمالی با احتساب خطای نشانگر) The rate of reduction of the disease index due to the selection of plants without non-paired marker band (due to the selection of possible resistant pure plants including marker error)
1	قبل از غربال با نشانگر مولکولی Before screening with molecular markers	326	4.67	---
2	حضور نشانگر ناجفت SR2-r بعد از غربال مولکولی (شامل بوته‌های حساس و هتروزیگوت مقاوم در جایگاه نشانگر) Presence of the SR2-r repulsion marker after molecular screening (including susceptible plants and heterozygotes resistant at the marker locus)	222	5.34	---
3	عدم حضور نشانگر ناجفت SR2-r بعد از غربال مولکولی (شامل بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه نشانگر) Absence of the SR2-r repulsion marker after molecular screening (including homozygous resistant plants at the marker locus)	104	3.26	1.41

است. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس سه صفت میانگین درصد آلودگی، شاخص آلودگی و درصد بوته‌های خالص مقاوم بر اساس نشانگر نشان می‌دهد که اگر نقطه برش نمودار از حدود عدد ۸ فرض شود، ژنوتیپ‌ها را می‌توان در شش گروه کاملاً حساس، نسبتاً حساس، نیمه حساس، نسبتاً مقاوم، مقاوم و کاملاً مقاوم گروه‌بندی کرد (شکل ۲). در جدول ۵ از میان ۲۵ ژنوتیپ آزمایشی، دامنه درصد بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه ژنی نشانگر SR2-r بین صفر تا ۹۰ درصد متغیر و عمدتاً با توجه به شجره آن‌ها مورد انتظار نیز است

نتایج جدول چهار بر اساس ارزیابی مقاومت ۴۶ ژنوتیپ در گلخانه ستاد مؤسسه و چهار ژنوتیپ در میکروپلات همدان و نیز آزمون مولکولی آن‌ها حاصل شده است. همان‌طور که از جدول چهار ملاحظه می‌شود با یک‌بار غربال مولکولی مواد اصلاحی در حال تفکیک چندرقدند برای ژن(های) مقاومت به ریزوکتونیا با استفاده از نشانگر مولکولی توسعه‌یافته SR2-r می‌توان با انتخاب بوته‌های خالص مقاوم (بوته‌های فاقد باند نشانگر آلل حساس) شاخص آلودگی را حدود ۱/۴۱ واحد کاهش داد و جمعیت اولیه را از حساس (نمره ۴/۶۷) به مقاوم (نمره ۳/۲۶) تبدیل کرد که نشان‌دهنده‌ی عکس‌العمل مناسب گزینش در نشانگر مذکور

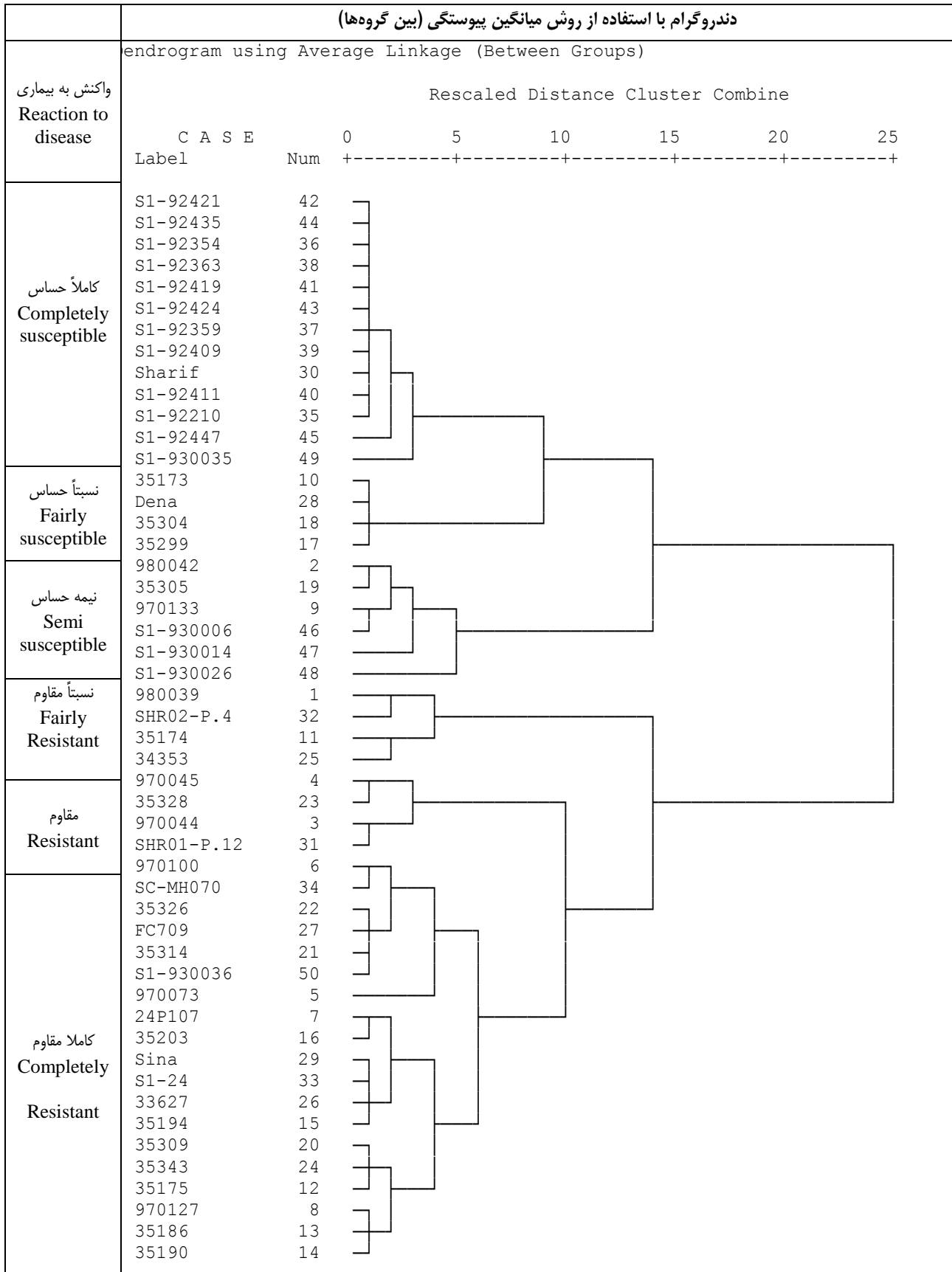
جدول ۵ نتایج غربالگری ژنوتیپ‌های مختلف چندرقدند با استفاده از نشانگر مولکولی SR2-r در گلخانه و مزرعه

Table 5. Screening results of sugar beet different genotypes using SR2-r molecular marker in the greenhouse and field

ردیف Row	سال Year	محل کاشت Cultivation place	شجره Pedigree	شماره بذر Seed book	تعداد بوته آزمون شده Number of plants tested	درصد ژنوتیپ هموزیگوت مقاوم A1A1%
1	2018	Greenhouse	FC709-F2-8726		10	90
2	2018	Kamalabad field	S1-930036		12	8
3	2018	Kamalabad field	27273-83	34214-96	12	33
4	2018	Kamalabad field	FC-221-HSF-1240-93	34215-96	12	75
5	2018	Kamalabad field	FC-221-HSF-1240-93	34216-96	6	83
6	2018	Kamalabad field	SB-26	33303-93	7	57
7	2018	Kamalabad field	SB-30-S1-89134	33644-94	7	14
8	2018	Greenhouse	S1-920541		47	17
9	2018	Greenhouse	S1-920128		53	58
10	2019	Kamalabad field	F2-920760*920128		261	35
11	2019	Kamalabad field	F2-920756*920633		64	48
12	2019	Kamalabad field	F2-920270*Saccara	F2-CG-3	13	23
13	2019	Kamalabad field	F2-920270*Saccara	F2-CG-5	47	6
14	2019	Kamalabad field	Bulk-S1-930151		232	66
15	2021	Kamalabad field	F1-Mix: OT-940171*OT Rhizoctonia (940049, 75, 156, 206)	35831	143	24
16	2021	Greenhouse	F2(OT-940079*OT-940184)	A	92	24
17	2021	Greenhouse	F2(OT-940087*OT-940184)	B	98	33
18	2022	Greenhouse	F2(OT-940150*OT-940184)	A1	125	77
19	2022	Greenhouse	F2(OT-940156*OT-940184)	A2	99	39
20	2022	Greenhouse	F1 (OT-940207*OT-940184)	A4	191	45
21	2022	Greenhouse	OT-201-9	OT-140002	10	0
22	2022	Greenhouse	OT-201-9	OT-140003	181	34
23	2023	Kamalabad field	F2 (S1-980004*SB53)	SE-101	332	44
24	2023	Kamalabad field	F2 (S1-980022*SB53)	SE-102	260	50
25	2023	Kamalabad field	F2 (S1-980046*SB53)	SE-103	340	31

A1A1%: درصد بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه ژنی نشانگر SR2-r

A1A1%: Percentage of homozygous resistant plants at the Sr2-r marker locus



شکل ۲ دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای

Fig 2. Genotypes classification using cluster analysis method

در جدول ۶ از میان ۴۵ هیبرید آزمایشی و پنج رقم تجارتي، دامنه درصد بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه ژنی نشانگر SR2-r بین صفر تا ۹۳ درصد متغیر است. به طوری که برخی هیبریدهای آزمایشی نسبت به شاهد‌های داخلی و خارجی آزمایش نیز برتری دارند.

جدول ۶ نتایج غربالگری هیبریدهای مختلف چغندر قند در آزمایش آگمنت ایستگاه مهندس مطهری کرج با استفاده از نشانگر مولکولی SR2-r در سال ۱۳۹۹

Table 6. Screening results of sugar beet different hybrids in augment experiment in Motahhri station using SR2-r molecular marker

ردیف Row	ارژین Origin	شماره دفتر Seed book	تعداد بوته آزمون شده Number of plants tested	درصد ژنوتیپ هموزیگوت مقاوم A1A1%
1	(7112 * SB36) * S1 - 960102	35158	11	91
2	(7112 * SB36) * S1 - 960104	35159	9	44
3	(7112 * SB36) * S1 - 960107	35160	9	67
4	(7112 * SB36) * S1 - 960108	35161	13	62
5	(7112 * SB36) * S1 - 960109	35162	11	55
6	(7112 * SB36) * S1 - 960110	35163	14	93
7	(7112 * SB36) * S1 - 960111	35164	13	0
8	(7112 * SB36) * S1 - 960113	35165	14	86
9	(7112 * SB36) * S1 - 960124	35166	12	8
10	(7112 * SB36) * S1 - 960132	35167	7	71
11	(7112 * SB36) * S1 - 960146	35169	7	86
12	(7112 * SB36) * S1 - 960147	35170	8	63
13	(7112 * SB36) * S1 - 960151	35171	10	80
14	(7112 * SB36) * S1 - 960156	35172	15	73
15	(7112 * SB36) * S1 - 960159	35173	6	33
16	(7112 * SB36) * S1 - 960160	35174	8	75
17	(7112 * SB36) * S1 - 960163	35175	10	40
18	(7112 * SB36) * S1 - 960173	35177	13	92
19	(7112 * SB36) * S1 - 970001	35178	9	56
20	(7112 * SB36) * S1 - 970003	35179	15	33
21	(7112 * SB36) * S1 - 970006	35181	18	61
22	(7112 * SB36) * S1 - 970008	35183	18	39
23	(7112 * SB36) * S1 - 970010	35185	11	73
24	(7112 * SB36) * S1 - 970011	35186	11	55
25	(7112 * SB36) * S1 - 970012	35187	14	0
26	(7112 * SB36) * S1 - 970013	35188	12	75
27	(7112 * SB36) * S1 - 970014	35189	10	70
28	(7112 * SB36) * S1 - 970015	35190	10	90
29	(7112 * SB36) * S1 - 970016	35191	15	73
30	(7112 * SB36) * S1 - 970017	35192	14	29
31	(7112 * SB36) * S1 - 970048	35222	15	80
32	(7112 * SB36) * S1 - 970053	35227	11	73
33	(7112 * SB36) * S1 - 970056	35230	13	92

ادامه‌ی جدول ۶

34	(7112 * SB36) * S1 - 970067	35240	14	71
35	(7112 * SB36) * S1 - 970072	35245	13	54
36	(7112 * SB36) * S1 - 970079	35252	10	70
37	(7112 * SB36) * S1 - 970084	35257	11	64
38	(7112 * SB36) * S1 - 970093	35265	16	0
39	(7112 * SB36) * S1 - 970098	35269	17	76
40	(7112 * SB36) * S1 - 970106	35275	13	54
41	(7112 * SB36) * S1 - 970110	35279	8	25
42	(7112 * SB36) * S1 - 970116	35281	9	78
43	(7112 * SB36) * S1 - 970119	35284	18	83
44	(7112 * SB36) * S1 - 970124	35287	5	80
45	(7112 * SB36) * S1 - 970132	35293	6	33
46	Sina	SBSI - 7	49	63
47	Novodoro	F - 20707	64	75
48	Modex	F - 20739	59	78
49	Loriquet	F - 20817	51	65
50	Pirola	F - 20803	56	71

A1A1%: درصد بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه ژنی نشانگر SR2-r

A1A1%: Percentage of homozygous resistant plants at the Sr2-r marker locus

در جدول ۷ از بین ۱۴ ژنوتیپ آزمایشی، دامنه درصد بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه ژنی نشانگر SR2-r بین صفر تا ۸۹ درصد متغیر و عمدتاً مورد انتظار است.

جدول ۷ نتایج بررسی وضعیت ژنوتیپی مقاومت به ریزوکتونیا در برخی ارقام و والدین هیبریدهای تجارتي چغندر قند

در گلخانه ستاد مؤسسه با استفاده از نشانگر مولکولی SR2-r

Table 7 Genotypic results of rhizoctonia resistance in some varieties and parents of sugar beet commercial hybrids in greenhouse using SR2-r molecular marker

ردیف Row	سال Year	اریزین Origin	تعداد بوته آزمون شده Number of plants tested	درصد ژنوتیپ هموزیگوت مقاوم A1A1%
1	2018)	Arta	80	50
2	2018	Jolgeh	18	0
3	2018	Rasoul	14	7
4	2021	Sina-201	18	39
5	2021	Sina-202	18	72
6	2021	Sina-203	18	39
7	2021	Sina-204	15	47
8	2021	Sina-205	18	67
9	2021	Sina-206	18	83
10	2021	Sina-207	18	72
11	2021	Sina-208	18	89
12	2021	Sina-220	18	83
13	2021	SHR-01-P-12	18	33
14	2021	Isabella	18	61

A1A1%: درصد بوته‌های خالص مقاوم در جایگاه ژنی نشانگر SR2-r

The percentage of resistant homozygous plants in SR2-r marker locus

برای ارزیابی صحیح نتایج در روش‌های مختلف اصلاح چغندر قند برای مقاومت به ریزوکتونیا نیاز به شناسایی صحیح گیاهان مقاوم است. برای این منظور از دو روش ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی می‌توان استفاده کرد که در مجموع، ارزیابی ژنوتیپی مزایای بیشتری نسبت به ارزیابی فنوتیپی مقاومت از جمله انتخاب هموزیگوت‌های مقاوم با استفاده از نشانگر ناجفت و یا نشانگرهای هم‌باز، سالم ماندن گیاه آزمون شده برای استفاده بعدی، استفاده از گیاهان در هر مرحله از رشد، مستقل بودن گیاه مورد آزمون از فصل یا شرایط محیطی، تمیز ماندن گلخانه و مزرعه از بیمارگر ریزوکتونیا، نیاز کمتر به کیج، ایزوله و آزمایش مشاهده‌ای برای یافتن تعدادی مشخص لاین مقاوم دارد (Norouzi et al. 2022). در جداول ۵ تا ۷، غربالگری و ارزیابی مولکولی تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها و هیبریدهای آزمایشی چغندر قند در طی سال‌های اخیر با نشانگر مولکولی توسعه‌یافته SR2-T نشان داده شده است. هرچقدر نسبت بوته‌های حساس در جمعیت اولیه بیشتر باشد عکس‌العمل گزینش به کمک نشانگر مولکولی مذکور در کاهش شاخص آلودگی بیشتر خواهد بود. این در حالی است که فقط از یک نشانگر مولکولی پیوسته به یکی از ژن‌های مقاومت به ریزوکتونیا در این تحقیق استفاده شده است ولیکن با توجه به ماهیت اولیگوژنی بودن واکنش مقاومت به این بیماری و سایر جایگاه‌های ژنی بزرگ اثر و کوچک اثر و تغییردهنده، اگر نشانگرهای مولکولی دیگری در آینده توسعه یابد و از مجموع آن‌ها در غربال مولکولی مواد اصلاحی چغندر قند استفاده گردد، آنگاه به مراتب دقت گزینش به کمک نشانگر افزایش و کاهش شدیدتری در میانگین شاخص آلودگی جمعیت اولیه صورت خواهد گرفت و بازدهی گزینش به کمک چندین نشانگر مولکولی بیشتر خواهد شد و با یک‌بار غربال مولکولی یک جمعیت در حال تفکیک برای ژن‌های مقاومت به ریزوکتونیا می‌توان به یک لاین اصلاحی خیلی مقاوم دست یافت.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق نتایج تکرارپذیری یک نشانگر مولکولی ناجفت (SR2-T) پیوسته به ژن‌های مقاومت به ریزوکتونیا که توالی آغازگرهای اختصاصی آن طراحی شده بود بررسی شد. برای این منظور، تعداد زیادی نمونه گیاهی که نمره آلودگی آن‌ها به ریزوکتونیا در گلخانه یا در میکروپلات به دست آمده انتخاب و پس از استخراج DNA، آزمون PCR با کمک آغازگرهای مرتبط با نشانگر مورد نظر انجام گرفت. سپس نتایج نمره آلودگی با نتایج مولکولی تک بوته‌ها مقایسه شدند. بدین ترتیب توافق کلی نشانگر مولکولی ناجفت با شاخص آلودگی به ریزوکتونیا در گلخانه و میکروپلات ۸۷ درصد به دست آمد. همچنین درصد حضور نشانگر مذکور در تعداد زیادی از لاین‌های گرده‌افشان، توده‌های اصلاحی، هیبریدها و ارقام تجارتي حساس و مقاوم بررسی شد. بر اساس نتایج آزمون نشانگر مولکولی در ژنوتیپ‌های مختلف، درصد حضور نشانگر ناجفت پیوسته به ژن‌های مقاومت به ریزوکتونیا بین صفر تا ۱۰۰ درصد متغیر و عمدتاً مورد انتظار بود. این نشانگر ناجفت در تحقیق حاضر قادر به شناسایی حدود ۴۸ درصد بوته‌های مقاوم به ریزوکتونیا بود، اما با توجه به حضور غیرقابل انتظار باندهای بسیار ضعیف در برخی ژنوتیپ‌های هموزیگوت مقاوم، پیشنهاد می‌شود در صورت امکان از Real-time PCR استفاده شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سپاسگزاری

به این وسیله نویسندگان مقاله از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند به خاطر فراهم آوردن امکانات لازم برای اجرای تحقیق حاضر تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

منابع مورد استفاده

- Buttner G, Pfähler B, Märlander B. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to *Rhizoctonia* root and crown rot. *Plant Breeding*, 2008; 123: 158-166. Doi:<https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00967.x>.
- Dellaporta S L, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983; 1: 19-21. Doi:<https://doi.org/10.1007/BF02712670>.
- Hassani M, Heidari B, Stevanato P, Campagna G, Broccanello C, Norouzi P, Concheri G, Panella L. A candidate single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to resistance to infection with *rhizoctonia* in sugar beet. 76th IIRB Congress, 2018; 5-7 June. Deauville, France.
- Herr LJ. Sugar beet diseases incited by *Rhizoctonia* species. pp. 341-350. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G (Eds.). *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Netherlands. 1996.
- Lein JC, Asbach K, Tian Y, Schulte D, Li C, Koch G, Jung C, Cai DG. Resistance gene analogues are clustered on chromosome 3 of sugar beet and co-segregate with QTL for rhizomania resistance. *Genome*, 2007; 50: 61-71. Doi:<https://doi.org/10.1139/g06-131>.
- Lein JC, Sagstetter CM, Schulte D, Thurau T, Varrelmann M, Saal B, Koch G, Borchardt DC, Jung C. Mapping of *Rhizoctonia* root rot resistance genes in sugar beet using pathogen response-related sequences as molecular markers. *Plant Breeding*, 2008; 127: 602-611. Doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.1525.x>.
- Mahmoudi SB, Mesbah M, Alizadeh A. Pathogenesis variation of *rhizoctonia solani* isolates of sugar beet. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 2004; 40: 253-283. (in Persian).
- Mahmoudi SB, Soltani J. Sugar beet root rot in Iran. *Newsletter of Iranian Sugar Industries Research and Training Center*, 2005; 16(178): 14-18. (in Persian).
- Nazari A. Identification of molecular markers linked to genes controlling *rhizoctonia* resistance in sugar beet. MSc thesis. Crop science and breeding department. AboureihanPardis. Tehran Univ. 2011.(in Persian).
- Norouzi P, Rahmani D, Oroojalian S, Mahmoudi B, Aghaeizadeh M, Kakuinejad M, Orazizadeh, MR, Vahedi S, Fathi MR. Confirmation of repulsion molecular markers linked to rhizomania resistance gene (Rz1) and evaluation of gene dose effect in sugar beet genotypes. *Journal of Sugar Beet*. 2013; 29: 133-145. (in Persian).
- Norouzi P, Sabzehzari M, Zeinali H. Efficiency of some molecular markers linked to rhizomania resistance gene (Rz₁) for marker assisted selection in sugar beet. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 2015; 18 (5): 319-323. Doi:<https://doi.org/10.1007/s12892-015-0033-9>.
- Norouzi P, Rajabi A, Fasahat P. Molecular markers in sugar beet. Agricultural education publishing, Tehran. 2022; 275 p. (in Persian).
- Nouhi AA, Amiri R, Haghazari A, Saba J, Mesbah M. Use of molecular marker for assay gene dosage resistant gene to rhizomania disease (Rz₁) in sugar beet (*Beta vulgaris L.*). *Asian Journal of Biotechnology*. 2009; 1(1): 37-41. Doi:<https://doi.org/10.3923/ajbkr.2009.37.41>.
- Panella, LW, Ruppel, EG. Availability of germplasm for resistance against *Rhizoctonia spp.* pp.515-527. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S and Dijst G. (Eds.). *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 1996.
- Rajabi A, Aghaezadeh M. Sugar beet breeding. Training course in KWS company. Einbeck, Germany, June-July. 2012. (in Persian).
- Ravi S, Hassani M, Heidari B, Deb S, Orsini E, Li J, Richards C, Panella L, Srinivasan S, Campagna G, Concheri G, Squartini A and Stevanato P. Development of an SNP assay for marker-assisted selection of

- soil-borne *Rhizoctonia solani* AG-2-2-IIIB resistance in sugar beet. *Biology*. 2022; 11 (49): 1-17. Doi:<https://doi.org/10.3390/biology11010049>.
- Scholten OE, Panella LW, De Bock TS, Lange W. A greenhouse test for screening sugar beet (*Beta vulgaris*) for resistance to *Rhizoctonia solani*. *European journal of plant pathology*, 2001; 107: 161-166.
- Sheikholeslam M. Diagnosis of fungi of sugar beet root rot and determining of their dispersion in Kermanshah province. Final report of project. 2001; 17 p. (in Persian).
- Windels C, Panella L, Ruppel E, Sugar beet germplasm resistant to *Rhizoctonia* root and crown rot withstands disease caused by several pathogenic isolates of *Rhizoctonia solani* AG-2-2. *Sugar beet. Research and Extension Reports*, 1995; 26: 179-185.