مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) با استفاده از نشانگر ISSR

حمیده کیخسروی[1]، مسعود دهداری*[2]، اسد معصومی اصل[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران.

[2]دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران.

[3]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰٤/۲۲

چکیده

چغندرقند یکی از مهمترین گیاهانی است که در تأمین غذای مردم جهان نقش کلیدی دارد و از نظر ارزش غذایی در ردیف برنج، ذرت، گندم، سیب‌زمینی و حبوبات قرار دارد. تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و طراحی برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۰ ژنوتیپ چغندرقند، از ۲۰ آغازگر ISSR استفاده گردید. بعد از استخراج DNA و تکثیر قطعات با استفاده از آغازگرهای ISSR، نوارهای حاصله امتیازبندی شدند و تجزیه‌های آماری صورت گرفت. شاخص‌های تنوع ژنتیکی به‌دست آمده در ژنوتیپ‌های چغندرقند مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به مکان UBC853 (۰/۳۸) و کمترین میزان PIC مربوط به مکان UBC847 (۰/۱۳) بود. همچنین بیشترین میزان شاخص شانون که نشان دهنده تنوع بین جمعیتی است، مربوط به مکان UBC830 (٤/۳۲) در حالی که مکان ژنی UBC847 دارای کمترین میزان شاخص شانون (۰/۵۸) بود. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ارقام را در ٤ گروه اصلی قرار داد. براساس نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی، سه مولفه اول به ترتیب ۷۲/٦۷، ۵/۹۹ و ٤/۰۵ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. گروهبندی حاصل از مولفه‌های اصلی، نتایج تجزیه خوشه‌ای را تا حدی تأیید کرد. از نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی چغندرقند استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: *چغندرقند، نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی، اطلاعات چند شکلی.*

* نویسنده مسئول: مسعود دهداری تلفن: ۰۹۱۷۱٤۳۲۰۳۷ Email: adehdari2000@yahoo.com

مقدمه

چغندرقند با نام علمی (*Beta vulgaris* L.) گیاهی دگرگشن، دیپلوئید و دو ساله از تیره اسفناج است که برای تولید ریشه ذخیره‌ای کشت می‌شود. طول دوره رشد چغندرقند، بسته به شرایط محیطی و ژنوتیپ، از ۵ تا ۹ ماه متغیر می-باشد و به عنوان گیاهی دیررس شناخته می‌شود (Khajehpor, 2011). چغندرقند یکی از دوازده گیاه اصلی است که غذای مردم جهان را تأمین می کند و از نظر ارزش غذایی در ردیف برنج، ذرت، گندم، سیب زمینی و حبوبات قرار می گیرد. قند یکی از عمده‌ترین و ارزان‌ترین موادغذایی است و به عنوان سرچشمه انرژی محسوب می شود. ساکارز تهیه شده از چغندرقند یک مکمل غذایی در سراسر جهان است که حدود ۳/۱ ساکارز جهان را شامل می شود (Basati, *et al*., 2003). منابع ژنتیکی گیاهی، علاوه بر زیربنای توسعه کشاورزی، به‌عنوان منبعی از سازگاری ژنتیکی، همچون سپری در برابر تغییرات محیطی عمل می‌کنند. این منابع تأمین‌کننده مواد خام ژنتیکی هستند که درصورت بهره‌برداری صحیح از آن‌ها، واریته‌های جدید و مطلوب‌تر گیاهی را می‌توان تولید کرد (Abdmishani & Shahnejat-Bushehri, 1997). جهت افزایش تولید و استفاده بهینه از منابع ژنتیکی و تنوع موجود در آن‌ها روش‌های معمول اصلاحی به تنهایی کافی نبوده و به نشانگرهای مولکولی به عنوان مکمل نیاز دارند. از آنجا که موفقیت هر به‌نژادگر نیز به تعیین تنوع و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی بستگی دارد، لذا ضروری است که تنوع موجود در جامعه گیاهی مورد مطالعه قرار گیرد (Nematzadeh *et al*., 2003). بدلیل تنوع کم و تأثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA به عنوان ابزارهای کارآمد و مکمل برای تعیین سطح تنوع و تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها به‌کار می‌روند (Babajanpour *et al*., 2009; Barzan *et al*. 2015; Saghalli *et al*. 2016). با توجه به موارد فوق‌الذکر برآورد تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند براساس صفات مورفولوژیکی، سخت است و نشانگرهای بیوشیمیایی نیز تنوع کمی را آشکار می‌کنند. اما نشانگرهای مولکولی توانایی تشخیص تنوع ژنتیکی در هر زمان و مکان به صورت وسیع دارند. نشانگرهای مولکولی تحت تاثیر محیط نیستند و پیشنهاد شده برای تعیین تشابه ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها استفاده شوند. در این میان نشانگر ISSR به طور گسترده‌ای برای تجزیه و تحلیل تنوع گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌است. هرچند از RAPD و SSR در چغندرقند برای شناسایی و نقشه‌برداری ژرم‌پلاسم نیز استفاده شده‌است (Qiaohong, *et al*., 2012). مزایای استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و ISSR در تشخیص تنوع ژنتیکی، سادگی، سرعت روش، حداقل DNA موردنیاز و هزینه کم است. گزارشات

مختلف در گیاهان مثل Wu *et al.* (2004) در برنج، Shahriari Ahmadi *et al.* (2012) در ژنوتیپ‌های پنبه، Kantetky *et al.* (1995) در ذرت، Naderi *et al.* (2015) در لاین‌های نخود، Rao *et al.* (2007) در ارقام زراعی و نژادهای وحشی نخود، Bornet *et al.* (2002) در ارقام سیب‌زمینی حاکی از قدرتمند بودن نشانگر ISSR در برآورد تنوع ژنتیکی در اکثر گیاهان است. از نشانگرهای مولکولی از جمله ISSR در چغندرقند نیز در چند مطالعه استفاده شده است.

Srivastara *et al.* (2007) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت دیپلوئید چغندرقند بررسی کردند. آنها ۳۲۷ نوار برای ۲۸ نشانگر RAPD و ۳۹ نوار برای چهار آغازگر ISSR مشاهده نمودند. متوسط محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) برای RAPD و ISSR به ترتیب ۰/٤۱ و ۰/٤٤ در مطالعه آنها بدست آمد. Wang and Goldman (1999) روابط ژنتیکی میان ۳۷ ژنوتیپ چغندر قند با استفاده از نشانگر RAPD مطالعه نمودند. نمودارهای دو بعدی منشا مشترک ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آنها به اثبات رسانید.

Smulders, *et al.*(2010) ۱۲نشانگر SSR را برای توصیف ٤۰ واریته دیپلوئید و تریپلوئید چغندرقند بکار گرفتند. آنها تکثیر ۲۱-۳ آلل را گزارش نمودند و اظهار داشتند که تنوع ژنتیکی در گونه‌های دیپلوئید از گونه‌های تریپلوئید خیلی بیشتر است. Abassi, *et al.* (2014) از ۱۸ نشانگر SSR برای ارزیابی ۱٦۸ ژنوتیپ حاصل از ۱۲ والد چغندرقند استفاده کردند. تجزیه خوشه-ای ژنوتیپ‌های گرده‌افشان را از ژنوتیپ‌های نرعقیم تفکیک نمود. در مطالعه دیگر Li *et al.* (2010) تنوع ژنتیکی ۱۱۱ اینبرید لاین حاصل از بذر و ۱۷۸ اینبریدلاین حاصل از دانه‌گرده را به کمک نشانگر SSR بررسی کردند. آنها دو زیر گروه کاملا مشخص در کل ژرم‌پلاسم معرفی کردند. اینبریدلاینهای حاصل از بذر از نظر گروه-های هتروتیک متفاوت از اینبریدلاینهای حاصل از دانه گرده بودند. با وجود مطالعات گسترده‌ای که روی بررسی تنوع ژنتیکی چغندرقند در داخل و خارج از کشور صورت گرفته است، اما بر روی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این مطالعه گزارشی در خصوص استفاده از نشانگرهای ISSR در دسترس نیست. با توجه به موارد فوق و این که استفاده از نشانگرهای ISSR نیازی به اطلاعات توالی ژنوم ندارد و منجر به ایجاد الگوهای چندجایگاهی و بسیار چندشکل می‌شود (Askari *et al.*, 2011; Ghasemi *et al.*, 2010; Zamani *et al.*, 2011; Zamani *et al.*, 2015)، به همین دلیل این مطالعه با بکارگیری ۲۰ ژنوتیپ چغندرقند و ۲۰ آغازگر ISSR طراحی گردید.

مواد و روش

به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی میان ۲۰ ژنوتیپ مختلف چغندرقند (جدول ۱)، از ۲۰ آغازگر ISSR با توجه به مطالعات قبلی(Izzatullayeva *et al.*, 2014) استفاده شد (جدول ۲). بذور و ژنوتیپ‌ها از موسسه اصلاح

و تهیه بذر چغندرقند کرج تهیه شدند. برای تهیه نمونه‌های برگی، از هر رقم ۱۲ عدد بذر در گلدان کاشته شد و پس از گذشت چهار هفته نمونه‌های برگ گیاهچه‌های جوان تهیه و به فریزر ۴۰- درجه‌سانتی‌گراد منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در این دما نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش Murray & Thampson, (1980) انجام گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۷ در صد تعیین شد. نمونه‌های DNA پس از تعیین غلظت، به غلظت ۱۵۰ میکرولیتر رقیق شدند DNA های ژنومی با کیفیت مطلوب برای انجام واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفتند. تکثیر DNA ژنومی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با دستگاه ترموسایکلر PCR-MJ Mini-BIO (RAD, Germany) انجام شد. تکثیر با آغازگرها و به کمک PCR صورت پذیرفت. محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵ درصد) Top vision آشکارسازی شد. رنگ آمیزی ژل‌ها با اتیدیوم بروماید (1µg/ml) صورت گرفت. در مرحله آخر از ژل با اشعه UV و توسط دستگاه ژل‌داک Gel) Logic QUANTUM ST4, Germany) عکس‌برداری شد. نوارهای ایجاد شده بوسیله هر آغازگر به صورت صفر و یک (به ترتیب برای عدم وجود و وجود) بدون در نظر گرفتن شدت نواردهی امتیازبندی شدند. تجزیه و تحلیل مشاهدات با استفاده از نرم افزارهای NTSYS PC 2.02 و Popgen32 صورت پذیرفت (Francis *et al.*, 1999). شاخص محتوای اطلاعات چند شکلیPIC با استفاده از فرمول $PIC= 1 - \Sigma Pi^2$ محاسبه شد (Botstein *et al.*, 1980). در این فرمول Pi فراوانی آلل i م در یک مکان مشخص می‌باشد. با توجه به ضریب همبستگی کوفنتیکی در نهایت تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انتخاب و انجام شد. سپس پراکنش ژنوتیپ‌ها با استفاده از نمودار سه بعدی حاصل از سه مولفه اصلی اول برای تایید یا عدم تایید گروهبندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بررسی گردید.

نتایج و بحث

با بررسی تعداد نوارهای چند شکل، آغازگرهای مطلوب شناسایی و برای کلیه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند که در نهایت ۱۹ جفت آغازگرهای ISSR نوارهای چند شکل را در ارقام مورد بررسی نشان دادند. و تنها یک آغازگر (UBC859) نتوانست تکثیر نماید و بنابراین نواری هم ایجاد نکرد. الگوی نواری حاصل از آغازگر UBC824 از سری آغازگرهای ISSR در شکل (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱ - مشخصات ژنوتیپ‌های چغندرقند مورد مطالعه.

Table 1- Description of the studied sugar beet genotypes.

ردیف No.	ژنوتیپ Genotype	شجره Pedigree	منشأ و محل جمع‌آوری Collection region and origin
1	SBSI.16	--------	Iran
2	32099	SC (7112* 261)* 5RR	Iran
3	32101	SC (7112*SB36)* 5RR	Iran
4	32102	SC (419*SB36)*5RR	Iran
5	32106	SC (7112*SB36)*5RR-HSF-33	Iran
6	32107	SC (419*SB36)*5RR-HSF	Iran
7	32109	SC (7112*SB36)*7221-34-IISF-7	Iran
8	32111	SC (7112*SB36)*7221-43-HSF-39	Iran
9	32113	SC (7112*SB36)*110-7-HSF-8	Iran
10	32116	SC (7112*SB36)*110-52-HSF-59	Iran
11	32117	SC (7112*SB36)*110-52-HSF-63	Iran
12	32122	SC (7112*SB36)*111-52-HSF-19	Iran
13	32123	SC (7112*SB36)*111-52-HSF-25	Iran
14	F- 20505	---------- ----------	Iran
15	Antic	----------	Gemany
16	Pars	----------	Iran
17	Doroti	----------	France
18	Shirin	----------	Iran
19	Karaji	----------	Iran
20	Marak	----------	Belgian

بجز نوارهای حاصل از آغازگرهای UBC834، UBC835، UBC845، UBC847، UBC848 و UBC851 نوارهای سایر آغازگرها ۱۰۰درصد چندشکل نشان دادند (جدول ۳). از کل ۱٤۹ نوار تولید شده ۱۵ نوار تک شکل(منومورف) و ۱۳٤ نوار از آنها چندشکل بودند. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به مکان ژنیUBC853 به مقدار ۰/۳۸و کمترین آن مربوط به مکان ژنی UBC847 به مقدار ۰/۱۳ بود (جدول ٤). محتوای اطلاعات چند شکلی به عنوان یکی از ویژگیهای مهم نشانگرهای مولکولی در نظر گرفته می‌شود و می‌تواند برای ارزیابی تمایز نشانگرها از هم بکار رود (Junjian *et al*., 2002).

جدول۲- مشخصات ۲۰ آغازگر ISSR مورد مطالعه.

Table 2- Description of the 20 studied ISSR markers.

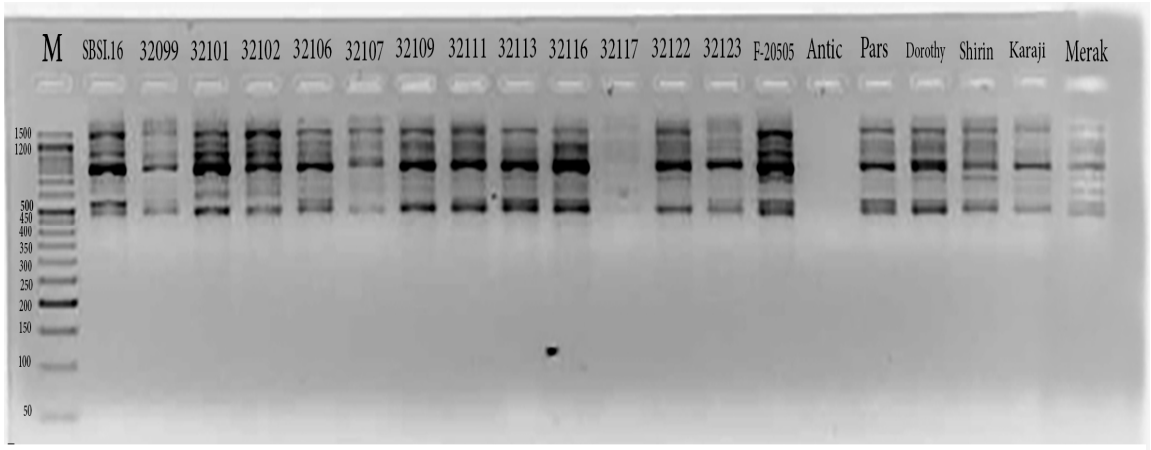
شماره No.	آغازگر Primers	توالی آغازگر 5′ → 3′ Sequences (5′ → 3′)	دمای اتصال (سلسیوس) Annealing temperature (Celsius)
1	UBC814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	44.6
2	UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	47.1
3	UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	47.1
4	UBC826	ACACACACACACACACC	47.1
5	UBC827	ACACACACACACACACG	47.1
6	UBC830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	47.1
7	UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	48
8	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	48
9	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAGYT	48
10	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAT	44.6
11	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	48
12	UBC847	CACACACACACACACACRC	48
13	UBC848	CACACACACACACACARG	48
14	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTYG	48
15	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	48
16	UBC855	ACACACACACACACACYT	48
17	UBC856	ACACACACACACACACYA	48
18	UBC857	ACACACACACACACACYG	48
19	UBC859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	48
20	UBC864	ATCATGATGATGATGATG	41.2

مقدار PIC در نشانگرهای UBC834 و UBC848برابر ۰/۱۹ بود، دلیل کم بودن این مقدار در نشانگرها، ممکن است به علت نرخ جهش بالاتر در توالی‌های تکراری دی نوکلئوتیدی باشد (Vigoruroux *et al*., 2005). در توافق با این پژوهش Srivastara *et al* (2007) مقدار PIC را در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام چغندر قند بوسیله نشانگر ISSR ۰/٤٤ گزارش کردند. آنها اثبات نمودند که کارآیی نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی چغندرقند بیشتر از نشانگرهای آیزوزایم است. مقدار PIC تابعی از تعداد و فراوانی آلل است. بیشترین میزان شاخص شانون مربوط به مکان UBC830 (٤/۳۲) که نشان دهنده تنوع جمعیتی است، بود. همچنین مکان UBC847 دارای کمترین میزان شاخص شانون (۰/۵۸) بود (جدول ٤). مکانهای ژنی که میزان شاخص شانون در آن‌ها بالاتر باشد، تنوع بین ارقام را بهتر نشان می‌دهند. شاخص شانون، نشان‌دهنده میزان چند شکلی آغازگر در مجموع ارقام است. مطابق با این پژوهش در مطالعات

دیگر این آغازگرها تنوع و چند شکلی زیادی را در ژنوتیپ‌های دیگر چغندر قند نشان داده‌اند. مثلا در بررسی ده رقم و لاین چغندرقند از هلند و چین با استفاده از شش تا از نشانگرهای ISSR فوق الذکر چندشکلی بالایی مشاهده شد. آزمون لاین ها به وسیله انگشت نگاری ISSR با استفاده از شش آغازگر توانست آنها را از هم متمایز کند (Qiaohong, *et al*., 2012). در تحقیقی دیگر از نشانگرهای RAPD و ISSR برای مقایسه تنوع ژنتیکی ٤٢ توده چغندرقند استفاده شد (Izzatullayeva *et al*., 2014). متوسط نوارهای چندشکل تشکیل شده توسط ISSR، ۹۷/۲٪ بود که بیشتر از نشانگر RAPD (۹۳٪) بود. میزان تنوع ژنتیکی بالایی به‌وسیله هر دو نشانگر گزارش شد، که این نشان داد دو نشانگر برای شناسایی تنوع ژنتیکی در توده‌های چغندرقند مناسب هستند. در مطالعه آنها دندروگرام حاصل از نشانگرهایRAPD و ISSR نشان داد که هر دو گروه‌بندی شباهتهایی با هم دارند (Izzatullayeva *et al*., 2014). در مطالعه دیگر از ۲۰ آغازگر ISSR مشابه با نشانگرهای مورد استفاده در این پژوهش برای بررسی تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری و انتخاب ژنوتیپ‌های موتانت متحمل به خشکی استفاده شد (Sen & Alikamanoglu, 2012). آنها توانستند تعدادی ژنوتیپ موتانت متحمل به خشکی را از این طریق شناسایی نمایند. علاوه بر نشانگر ISSR از سایر نشانگرها بخصوص SSR هم در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چغندرقند استفاده شده است که همانند مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی وسیعی گزارش شده است(Smulders, *et al*. 2010; Abassi, *et al*. 2014; Li, *et al*.).

دامنه ضریب تشابه بدست آمده از نشانگر ISSR در این تحقیق از ۰/۱٤ بین دو رقم مراک و آنتیک تا ۰/۹۳ بین دو رقم ۳۲۱۰۹ و ۳۲۱۰٦ متغیر بود (مشاهدات نشان داده نشده‌اند). در کارهای اصلاحی ارقامی که کمترین تشابه را با هم دارند، بهترین ارقام برای کارهای اصلاحی در دورگه‌گیری هستند و بر عکس ارقامی که بیشترین تشابه ژنتیکی را با هم دارند برای برنامه های اصلاحی چندان مناسب نیستند. در نتیجه از بین ارقام مورد مطالعه، احتمالا رقم‌های آنتیک و مراک برای تلاقی و طراحی برنامه‌های اصلاحی مطلوب هستند هرچند که به ویژگی‌های مهم زراعی آنها هم باید توجه شود.

ضرایب تشابه ژنتیکی میان ۱۰ ژنوتیپ در مطالعه دیگر روی چغندر قند به کمک شش آغازگر ISSR در محدوده ۰/٤۳ تا ۰/۸۳بود که بیشتر از مقادیر بدست آمده در این مطالعه می باشند (Qiaohong, *et al*., 2012). مسلما با توجه به مشابه بودن آغازگرها دلیل این اختلاف را می توان به ماهیت ژنوتیپ‌های مورد استفاده ارتباط داد یعنی تنوع مشاهده شده در ژنوتیپ‌های مطالعه حاضر بیشتر بوده است.



شکل ۱- الگوی نواری آغازگر UBC840 در ۲۰ ژنوتیپ چغندرقند (آگارز ۱/۵ درصد). چاهک اول(M) نشانگر راهنما بر اساس جفت باز و چاهک‌های دیگر مربوط به ژنوتیپ‌ها می‌باشند.

Figure 1- The bands pattern of UBC824 primer (agarose1.5 percent) in the 20 studied sugar beet genotypes. The first column (M) is related to ladder marker (M) and the other columns are related to genotypes.

جدول ۳- تعداد نوارهای تکثیر شده و چندشکل تولید شده توسط هر آغازگر

Table 3- Total and polymorphism number of bands produce with each primer.

ردیف N.o	پرایمر Primer	درصد نوارهای چند شکل Polymorphism bands percentage	تعداد کل نوار تولید شده Total number of bands	تعداد نوار چند شکل Polymorphism number of bands	تعداد نوار تک شکل Monomorphic number of bands
1	UBC814	100	7	7	0
2	UBC823	100	7	7	0
3	UBC824	100	4	4	0
4	UBC826	100	5	5	0
5	UBC827	100	8	8	0
6	UBC830	100	11	11	0
7	UBC834	80	10	8	2
8	UBC835	90	11	10	1
9	UBC840	100	10	10	0
10	UBC842	100	7	7	0
11	UBC845	62	8	5	3
12	UBC847	30	11	4	7
13	UBC848	88	8	7	1
14	UBC851	88	8	7	1
15	UBC853	100	4	4	0
16	UBC855	100	9	9	0
17	UBC856	100	7	7	0
18	UBC857	100	7	7	0
19	UBC864	100	7	7	0

جدول ٤- شاخص‌های تنوع ژنتیکی آغازگرهای ISSR در ژنوتیپ‌های چغندرقند

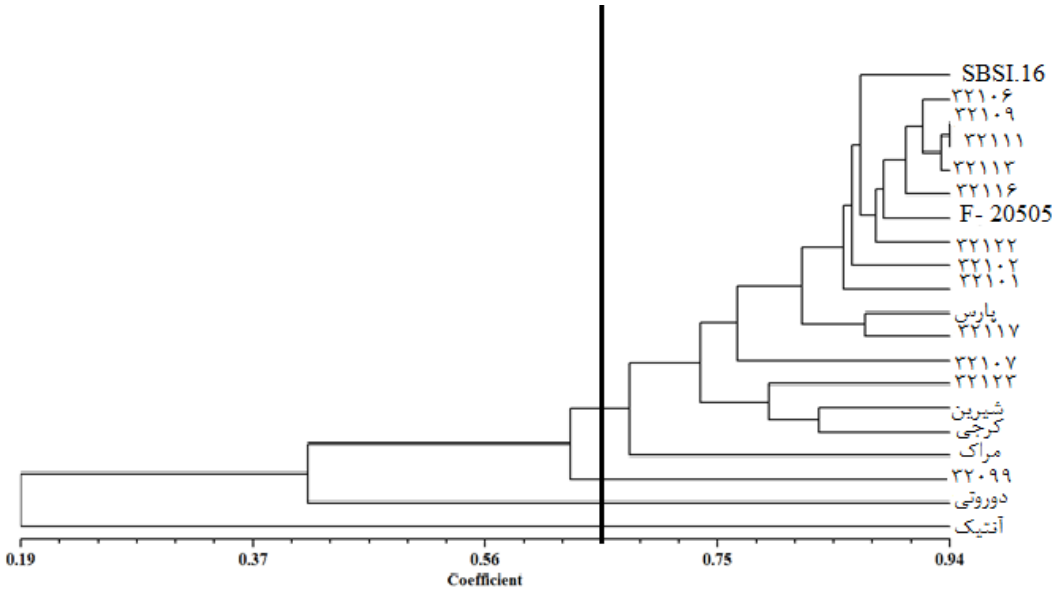
Table 4- Genetic diversity indices of ISSR markers in sugar beet genotypes.

ردیف No.	آغازگر Primer	محتوی اطلاعات چندشکلی(PIC) Polymorphism content information	شاخص شانون Shannon index
1	UBC814	0.33	2.65
2	UBC823	0.23	2.54
3	UBC824	0.19	0.79
4	UBC826	0.13	1.36
5	UBC827	0.31	3.22
6	UBC830	0.29	4.32
7	UBC834	0.19	2.43
8	UBC835	0.27	3.74
9	UBC840	0.24	3.82
10	UBC842	0.22	2.39
11	UBC845	0.26	1.15
12	UBC847	0.13	0.58
13	UBC848	0.19	2.16
14	UBC851	0.30	2.35
15	UBC853	0.38	1.50
16	UBC855	0.32	3.98
17	UBC856	0.14	2.00
18	UBC857	0.33	2.68
19	UBC864	0.20	2.65

گروه‌بندی ارقام براساس مشاهدات مولکولی

براساس دندروگرام حاصل از نشانگر مولکولی ISSR، ۲۰ رقم چغندر قند در ٤ گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۲). نتایج حاصل نشان داد که ارقام FSBI.16، ۳۲۱۰٦، ۳۲۱۰۹، ۳۲۱۱۱، ۳۲۱۱۳، ۳۲۱۱٦، ۲۰۵۰۵ -F، ۳۲۱۲۲، ۳۲۱۰۲، ۳۲۱۰۱، پارس، ۳۲۱۱۷، ۳۲۱۰۷، ۳۲۱۲۳، شیرین، کرجی و مراک در یک گروه قرار گرفتند، که در مجموع ۸۵ درصد ژنوتیپ‌ها می‌باشند. در گروه‌های دوم، سوم و چهارم به ترتیب ارقام ۳۲۰۹۹، دوروتی و آنتیک قرار گرفتند. بعبارت دیگر از نظر نشانگرهای بکار رفته بیشترین تنوع مشاهده شده میان این سه رقم با هم و با گروه یک بوده است. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR نشانگری کارا جهت آشکارسازی روابط مولکولی بین ارقام مورد آزمایش می‌باشد. به این معنی که نشانگر ISSR ابزار مهمی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در چغندرقند می‌باشد. از بررسی‌های انجام شده برای گروه‌بندی ارقام مورد آزمایش چغندرقند می‌توان چنین استنباط کرد که سطح تنوع ژنتیکی بین آنها در حد مطلوبی است. به طوری که در آینده می‌توان با برنامه‌های اصلاحی مناسب در جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه در کشور گام‌های اساسی برداشت. علاوه بر این، روابط مولکولی ایجاد شده از این مطالعه که

نشان دهنده روابط بین ارقام چغندرقند مورد بررسی هستند، ممکن است در برنامه‌های اصلاحی چغندرقند مفید باشند و با دقت و توجه کافی به گروه‌بندی‌های ایجاد شده برای ارقام موجود، به سهولت می‌توان ارقام مناسب را جهت برنامه‌های بهنژادی انتخاب نمود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد نشان داد که دو رقم FBSI.16 و آنتیک از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با هم دارند. بنابراین میتوان انتظار داشت با تلاقی بین آنها که در گروه‌های دور از هم قرار گرفته‌اند، نتاج نوترکیب متجاوز جهت انتخاب در برنامه‌های اصلاحی تولید شود. چرا که یکی از راههای مطمئن برای دستیابی به هتروزیس بالا، استفاده از موادی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند و شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم‌ترین قدم در تولید محصولات دورگ است و معمولاً والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند دورگ‌های با عملکرد بالاتر تولید کنند.



شکل ۲- گروه بندی ارقام چغندر قند براساس مشاهدات مولکولی نشانگر ISSR به روش UPGMA

Figure 2- Classification of sugar beet genotypes based on ISSR markers data using UPGMA method.

نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی

نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که سه مولفه اول حدود ۸۲/۷۲ درصد از تنوع کل بین لاین‌ها را تبیین کردند (جدول ۵). مولفه اول ۷۲/۶۷ درصد، مولفه دوم ۵/۹۹ درصد و مؤلفه سوم ۴/۰۵ درصد از تغییرات کل را تبیین کردند. یعنی نشانگر ISSR مورد استفاده دارای توزیع نسبتاً مناسبی در سطح ژنوم بوده‌اند، پراکنش

ژنوتیپ‌ها در یک نمودار سه بعدی براساس سه مولفه اصلی اول، همانند گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای چهار گروه را معرفی کرد و توانست ارقام را تفکیک کند (شکل ۳). اما با وجود شباهتهای زیاد تفاوت‌هایی نیز مشاهده شد. بطور مثال، ژنوتیپ آنتیک در هر دو روش در یک گروه قرار گرفت ژنوتیپ ۳۲۱۱۷ در روش مولفه‌های اصلی نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها فاصله گرفته و در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت. در نمودار سه بعدی ژنوتیپ ۳۲۰۹۹ با ژنوتیپ‌های ۳۲۱۲۳، شیرین و کرجی در یک نقطه تجمع یافته‌اند، ولی در نمودار تجزیه خوشه‌ای فقط ژنوتیپ ۳۲۰۹۹ به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار گرفت. شایان ذکر است که کم بودن درصد تبیین تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چند متغیره مانند تجزیه به مولفه‌های اصلی می‌تواند ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای مولکولی در سراسر ژنوم و در نتیجه عدم کفایت سه مولفه اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد. از طرفی توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر مولکولی به دلیل نمونه-برداری مناسب از کل ژنوم است (Fazli & HaghMyrza, 2012).

در اکثر مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی بوسیله نشانگرهای مولکولی گروهبندی ژنوتیپ‌ها نیز صورت می‌گیرید. هدف اصلی در اینجا انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای ادامه کارهای اصلاحی می باشد. در این راستا ژنوتیپ‌هایی انتخاب می شوند که حداکثر فاصله ژنتیکی از هم داشته باشند. با توجه به اینکه مقدار هتروزیس به دو عامل یعنی غالبیت و تفاوت بین والدین بستگی دارد این روند قابل توجیه می‌باشد. از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی برای گروهبندی ژنوتیپ‌های چغندر قند بر اساس مشاهدات نشانگر ISSR در چند مطالعه استفاده شده است (Qiaohong, *et al*., 2012; Sen & Srivastara *et al*. 2007 ;Alikamanoglu, 2012). همانند نتایج این پژوهش در تمامی این مطالعات نشانگرهای ISSR را ابزاری قدرتمند برای اهداف مختلف از جمله انگشت‌نگاری و بررسی تنوع ژنتیکی معرفی نموده‌اند.

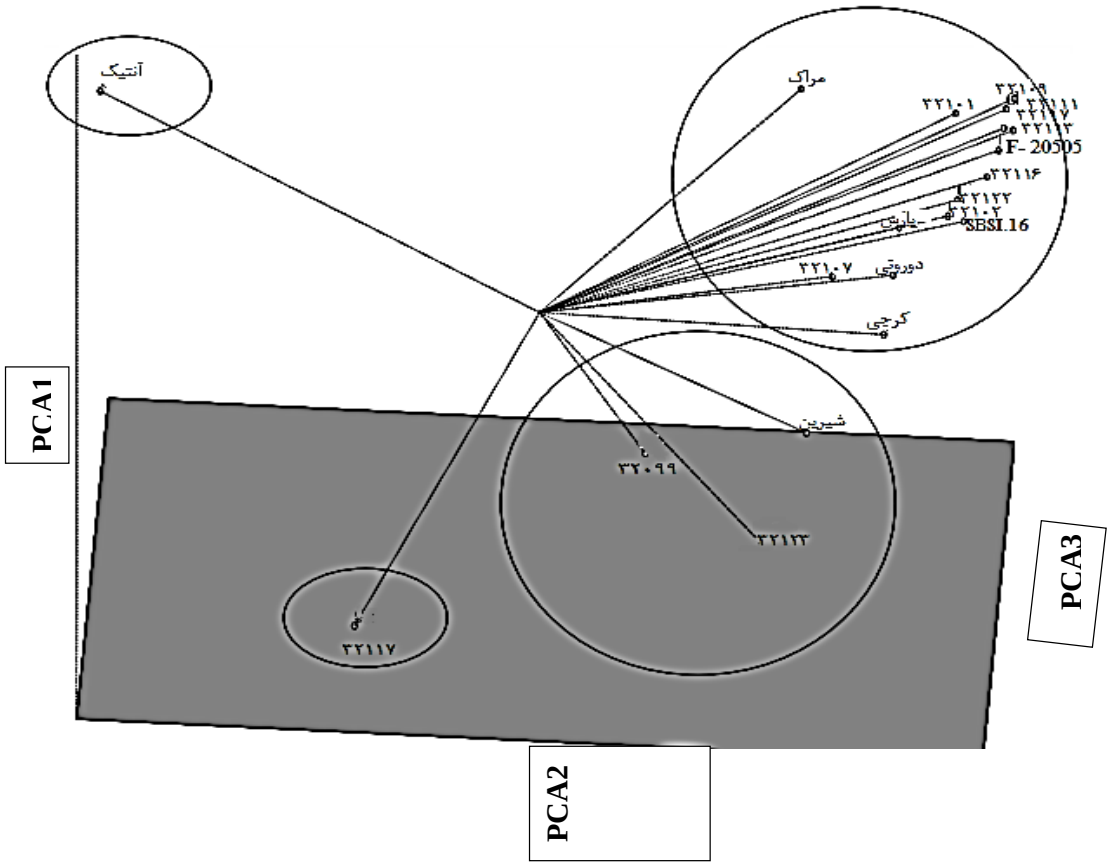
سپاسگزاری

نگارندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر چغندرقند بدلیل در اختیار گذاشتن مواد گیاهی بعمل می‌آورند.

جدول ۵- مشخصات سه مؤلفه اول بر اساس مشاهدات ISSR.

Table 5- Characteristics of the first three principal components based on ISSR observations.

مولفه‌ها Components	مقادیر ویژه Eigenvalues	واریانس جزء Proportion variance	واریانس تجمعی Cumulative variance
1	14.53	72.67	72.67
2	1.19	5.99	78.67
3	0.81	4.05	82.72



شکل ۳- گروهبندی ژنوتیپ‌های چغندر قند بوسیله سه مولفه اول حاصل از مشاهدات نشانگر ISSR.

Figure 3– Sugar beet genotypes grouping by the first three components based on observations of ISSR markers.

منابع

Abbasi Z, Arzani A, Majidi MM (2014). Evaluation of genetic diversity of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) crossing parents using agro-morphological traits and molecular markers. Journal of Agricultural Science and Technology 16: 1397-1411.

Abdmishani C, Shahnejat- Bushehri AA (1997). Advanced Plant Breeding. Volume 1. Tehran University Press, 133pp.

Askari N, Mohammad Abadi MR, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222–229.

Babajanpour AA, Nematzadeh GA, Majidi E, Ebrahimi A, Hajipour A, Hashemi SHR, Alavi SM (2009). Study of variation and genetic relationships among some rice varieties via agronomic traits and RAPD markers. Journal of Crop Breeding 1: 38-49.

Barzan Z, Dehdari M, Amiri Fahliani R (2015). Study of genetic diversity in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes using microsatellite markers. Journal of Agricultural Biotechnology 17:29-41.

Basati J, Kolivand M, Neamati A, Zarei A (2003). Evaluation autumn sowing of sugar beet in warm regions of Kermanshah province. Sugar beet magazine 18: 130-119.

Bornet B, Goraguers F, Joly G, Branchard M (2002). Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes detected by inter- simple sequence repeats (ISSR). Genome 45: 481-484.

Botstein DR, White L, Skolnick M, Davis (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. American Journal of Humman Biology 32: 314-331.

Fazli P, HaghMyrza K (2011). Study of genetic diversity in native chickpea mass with markers ISSR. Modern Genetics 6: 104-97.

Francis CY, Cai Yang R (1999). Popgene version 1.31. A joint project development by University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International, available at: http://ftp microsoft.com/Softlib/Mslfiles.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010). Determination ofgenetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Australian Journal of Basic Applied Science 4: 5758–5760.

Izzatullayeva V, Akparov Z, Babayeva S, Ojaghi J, Abbasov M (2014). Effciency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet. Turkish Journal of Biology 38: 429-438.

Kantetky RV, Zhang X, Bennetzen JL, Zehr BZ (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding 1:365–372.

Khajehpor, D. 2011. Industrial plants. Jihad Esfahan University. 326 p.

Li J, Schulz B, Stich B (2010). Population structure and genetic diversity in elite sugar beet germplasm investigated with SSR markers. Euphytica 175:35–42.

Murray GC, Thampson WF (1980). Rapid isolation of high molecular DNA. Nucleic Acid Resources 8: 4321-4325.

Junjian N, Colowitm PM, Mackill D (2002). Evaluation of genetic diversity in rice subspecies by microsatellite markers. Crop Science 42: 601-607.

Naderi H, Shokrpur M, Asghari AS, Kanooni H, Esfandiari AS (2015). Genetic diversity of pea lines using molecular markers ISSR. Iranian Field Crop Science 45: 519-505.

Nematzadeh GH, Talebie R, Khodarahmpour Z, Kiani GH (2003). Study of genetic and geographical variation in rice (*Oryza sativa* L.) using physiological and agronomical traits. Iranian Journal of Crop Science 5:225-234.

Qiaohong L, Dayou C, Lin Y, Chengfei L, Fanjiang K, Yumei W (2012). Construction of digital fingerprinting and cluster analysis using ISSR markers for sugar beet cultivars (lines). Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering 28: 280-284.

Rao LS, Usha Rani P, Deshmukh PS, Panguluri SK (2007). RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetics Resources and Crop Evolution 54: 1235-1244.

Saghalli A, Farkhari M, Salavati A, Alamisaeid K, Abdali A (2016). Genetic diversity assessment of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) ecotypes using ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology 23: 51-64.

Sen A, Alikamanoglu S. (2012). Analysis of drought-tolerant sugar beet (Beta vulgaris L.) mutants induced with gamma radiation using SDS-PAGE and ISSR markers. Mutation Research (738– 739): 38– 44 .

Shahriari Ahmadi FA, Salehi M, Ghasemi Omran VA, Ramezani Moghadam MR (2012). Genetic diversity between some genotypes of cotton (*Gossypium* sp.) In Iranian germplasm using molecular markers between Ryzmahvarh ISSR. Iranian Journal of Crop Research 10: 680-674.

Smulders MJM, Esselink JD, Everaert I, Riek JD, Vosman B (2010). Characterization of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) varieties using microsatellite markers. BMC Genetics 11: 1-11.

Srivastava S, Gupta PS, Saxena VK, Srivastava HM (2007). Genetic diversity analysis in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) using isozymes, RAPD and ISSR markers. Cytologia 72: 265–274.

Vigoruroux Y, Mitchell S, Matsuoka Y, Hamblin M, Kresovich S, Smith JSC, Jaqueth J, Smith OS, Doebley J (2005). An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellite. Genetics 169: 1617-1630.

Wang M, Goldman IL (1999). Genetic distance and diversity in table beet and sugar beet accessions measured by randomly amplified polymorphic DNA. Journal of American Society and Hort Science 124:630–635.

Wu C J, Cheng Huang ZQXQ, Yin SH, Cao KM, Sun CR (2004). Genetic diversity among and within population of *Oryza granulata* from Younnan of China revealed by RAPD and ISSR markers. Implications for the endangered species. Plant Science 167: 35-42.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Ruminant Research 132: 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2011). Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 10: 1812–1817.

Evaluation of genetic diversity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes using ISSR markers

Keykhosravi H.[1], Dehdari M.*[2], Masoumiasl A.[3]

[1]Graduate student of plant breeding, University of Yasouj, Iran.
[2]Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Iran.
[3]Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Iran.

Abstract

Sugar beet is one of the most important plants playing a key role in human food production in the world. Sugar beet has nutritional value as rice, corn, wheat, potato and beans. The estimation of genetic diversity of plant material is the first step for identification, conservation of genetic resources and designing of breeding programs. In order to study the genetic diversity of 20 sugar beet genotypes, 20 ISSR primers were used. After DNA extraction and PCR amplification, using ISSR primers the scores (0 and 1 for absent and present band, respectively) of resulting bands subjected to statistical analyses. Genetic diversity indices of ISSR markers in the studied sugar beet genotypes showed that UBC853 and UBC847 had the highest (0.38) and lowest (0.13) values of polymorphism information content respectively. Also UBC830 locus had the highest rate (4.32) of Shannon diversity index, which represents the genetic diversity among populations, whereas UBC847 had the lowest (0.58) Shannon index. Cluster analysis based on molecular data using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method, classified the sugar beet genotypes into four major groups. Based on the results of principal components analysis, the first three principal components explained 72.67, 5.99 and 4.05 percent of total (82.72%) total variation indicating ISSR markers have good distribution in the whole genome. The classification of the sugar beet genotypes based on the first principal components, had similarities and differences with cluster analysis. Results of this study can be used in breeding programs of sugar beet.

***Keywords**: Sugar beet, ISSR markers, genetic diversity, polymorphic information content.*

* Corresponding Author: Dehdari M. Tel: 09171432037 Email: : adehdari@yu.ac.ir

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500