

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چغندر قند مقاوم و حساس به نماتد سیستی

Heterodera schachtii با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSRپریناز عسکری نژاد^۱، جعفر وطن دوست^۲ و مهدی نصر اصفهانی^{۳*}^۱ سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی^۲ سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، گروه زیست‌شناسی^۳ اصفهان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بخش تحقیقات

گیاه پزشکی

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲

چکیده

چغندر قند با نام علمی *Beta vulgaris* L. گیاهی است دولپه و دوساله از خانواده اسفناجیان که اهمیت اقتصادی آن به دلیل خاصیت منحصر به فرد آن در تولید مقادیر بالای قند می‌باشد. نماتد سیستی چغندر قند مهم‌ترین بیماری‌های چغندر قند در اراضی تحت کشت این محصول به شمار می‌آید. این مطالعه به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند مقاوم و حساس به نماتد سیستی، با استفاده از نشانگر مولکولی SSR انجام گردید. تکثیر قطعات ژنومی با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر اختصاصی SSR انجام شد به طوری که از بین باندهای حاصل، ۴۹ باند چندشکل از ۷ جفت آغازگر منتخب به دست آمد. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی و بیشترین مقدار شاخص نشانگر به ترتیب مربوط به جفت آغازگرهای REP و ۱۰۱۱۴ بدست آمد. در این مطالعه بیشترین تشابه ژنتیکی بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس به نماتد سیستی چغندر قند مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که تنوع ژنتیکی ایجاد شده رابطه مستقیمی با مقاوم یا حساس بودن ژنوتیپها ندارد. در واقع مشخص گردید که ژنوتیپهای چغندر قند از نظر ژنتیکی بر اساس طیف‌های مختلف مقاومت، حساسیت و متحمل بودن به بیماری نماتد سیستی در گروه‌های مجزا قرار نگرفتند و همبستگی قابل توجهی را نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: چغندر قند، تنوع ژنتیکی، نشانگر SSR، نماتد سیستی

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۱۳۷۸۸۵۴۷۸، پست الکترونیکی: mne2011@gmail.com

مقدمه

رویت می‌باشند (۱۷). نماتد چغندر قند در سال ۱۸۵۰ توسط هرمان شاخنت در آلمان به عنوان آفت چغندر قند مشاهده و در سال ۱۸۷۱ توسط آدولف اشمیت نامگذاری گردید. نماتد چغندر قند اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۸ از مزارع چغندر قند تربت حیدریه استان خراسان جمع‌آوری شد و پس از آن در مزارع چغندر قند مشهد، بیرجند، مرودشت، اراک و میاندوآب گزارش شد (۲). شناسایی مولکولی نماتدهای انگل گیاهی، به خصوص نماتدهای

Heterodera schachtii نماتد مولد سیست چغندر قند با نام علمی *Heterodera schachtii* مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری در چغندر قند و یکی از زیانبارترین عوامل بیماری‌زایی در اراضی تحت کشت این محصول به شمار می‌رود. از نشانه‌های حمله این بیماری، ضعف، زردی، کاهش عملکرد و کاهش کیفیت محصول در چغندر قند است (۴). گیاهان آلوده، دارای ریشه اصلی کوتاه بوده و ریشه‌های فرعی متعددی همراه با سیست‌های سفید رنگ بر روی ریشه‌های فرعی قابل

RFLP (۵) و SSR (۵، ۷، ۱۵) استفاده شده است که برای شناسایی تعداد محدودی از جمعیت‌های گونه *H. Schachtii*، RFLP نواحی ITS ژن rDNA مورد استفاده قرار گرفته است.

از آنجایی که نشانگر ریز ماهواره یا توالی‌های ساده تکراری (SSR)، به علت توزیع فراوان خود در ژنوم و توان بالا در تجزیه و تحلیل، نشانگر انتخابی مناسب در ژنوم بسیاری از حیوانات و گیاهان می‌باشند، در این پژوهش برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف چغندر قند مقاوم و حساس به نماتد سیستی و بررسی قرابت ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف چغندر قند با طیف‌های مختلف مقاومت در هر گروه و نیز چگونگی همبستگی ژنوتیپ‌ها در طیف‌های مختلف از نشانگر SSR استفاده شد.

مواد و روشها

در این مطالعه ۲۰ نژادگان چغندر قند که از موسسه‌ی تحقیقات چغندر قند کرج تهیه شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. این بذور از نظر جوانه زنی شامل انواع مونوژرم (تک جوانه ای) و مولتی ژرم (چند جوانه ای) بوده و از نظر نحوه تولید به ارقام تجاری، هیبرید، تلاقی‌های برادر خواهر ناتنی و گرده افشان تقسیم می‌شوند. مشخصات ۲۰ ژنوتیپ مورد آزمون در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج DNA: بعد از کشت بذور در گلخانه و گذشت حدود یک ماه، از برگ‌های تازه و جوان جهت استخراج DNA استفاده شد. استخراج DNA بر اساس روش تغییر یافته روش استخراج CTAB انجام شد (۶) و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید.

تکثیر قطعات DNA: جهت انجام PCR و بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف چغندر قند مقاوم، متحمل و حساس به نماتد سیستی از ۱۰ جفت آغازگر SSR استفاده

می‌تواند بر پایه روش‌های مبتنی بر PCR بسیار سریع‌تر و راحت‌تر از روش‌های دشوار و وقت‌گیر مورفولوژیکی باشد (۸، ۱۳). غالباً برای مبارزه با نماتد سیستی، روش‌هایی مانند تناوب ۳ تا ۷ ساله با گیاهان غیر میزبان، ضد عفونی خاک با سموم شیمیایی ضد نماتد، استفاده از گیاهان تله و استفاده از ارقام مقاوم چغندر قند توصیه شده است (۱۸۱۷). استفاده از ارقام مقاوم در مبارزه با آفات و بیماری‌های گیاهی و بالاخص نماتد سیستی چغندر قند از روش‌هایی است که کمترین هزینه را برای کشاورز داشته و قابل اجرا در سطوح وسیع می‌باشد. این روش همچنین فاقد اثرات سوء زیست محیطی با توجه به استانداردهای تولید محصولات می‌باشد. نکته قابل توجه در این بحث عدم مشاهده مقاومت به نماتد در چغندر قندهای زراعی است، این در حالی است که در گونه‌های وحشی *B. webbiana*، *Beta procumbens* و *B. pattellaris* مقاومت به صورت کامل و غالب و در گونه *B. maritima* به صورت مغلوب به ارث می‌رسد (۱۰).

لذا با توجه به اینکه روش‌های ارزیابی کلاسیک گزینش مقاومت به بیماری از نوع فنوتیپی و وابسته به شرایط محیطی و یکنواختی عامل آلوده کننده بوده و در فصل خاصی از سال انجام گرفته و نیز بعضی از گیاهان از عامل آلوده کننده به نحوی می‌گریزند و به ظاهر مقاوم تلقی می‌شوند، از این رو با استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان روش تکمیلی یا جایگزین می‌توان گیاهان در بردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. نشانگرهای DNA می‌توانند ابزارهای مفیدی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم باشند و باعث صرفه‌جویی در زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب گردند (۹، ۱۱).

در تحقیقات گذشته، ارزیابی مقاومت نژادگان چغندر قند نسبت به نماتد سیستی و همچنین ارزیابی روابط ژنتیکی و تنوع ژنتیکی در داخل و بین ژنوتیپ‌های چغندر قند از نشانگرهایی همچون ایزوزیم‌ها، RAPD و ISSR (۱۶)،

مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای SSR تکثیر گردیدند. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۳ درصد در بافر $\times 0.5$ TAE و با ولتاژ ثابت ۹۰ به مدت ۱۲۰ دقیقه انجام شد. مشاهده و عکسبرداری ژل متأثر شده از رنگ GelRed در زیر نور UV به کمک دستگاه ژل نگار صورت گرفت.

جمع‌آوری داده‌ها: تصویر ژل‌های الکتروفورز حاصل از آغازگرهایی که باندهای چندشکل با وضوح مناسب تولید کرده بودند، به صورت دستی تجزیه شد. سپس به حضور یا عدم حضور یک باند در هر نمونه، با استفاده از اعداد صفر و یک امتیازدهی و در نهایت ماتریس داده‌ها در نرم-افزار NTSYS-pc مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۲ میکرولیتر آغازگر، ۱ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۳ میکرولیتر تک دی ان آ پلیمرز، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱۶/۲ میکرولیتر آب دیونیزه بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی-گراد، واسرشتگی به مدت ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی-گراد، اتصال به مدت ۱ دقیقه که دمای اتصال با توجه به نوع پرایمر از ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی-گراد متفاوت بود، گسترش به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه و گسترش نهایی به مدت ۸ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی-گراد بود. مراحل واسرشتگی تا گسترش ۳۵ مرتبه تکرار و در نهایت DNA ژنوتیپ‌ها

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد آزمون از نظر نحوه اصلاح، جوانه زنی بذر و مقاومت به نماتد

ردیف	شماره ژنوتیپ	نحوه اصلاح	جوانه زنی	مقاومت به نماتد
۱	۳	تلاقی برادر خواهر ناتنی	مولتی ژرم	مقاوم
۲	۷	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	متحمل
۳	۱۱	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	متحمل
۴	۱۵	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	متحمل
۵	۱۹	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	حساس
۶	۲۱	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	متحمل
۷	۲۵	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	متحمل
۸	۲۹	هیبرید	مونوژرم	مقاوم
۹	۳۳	گرده افشان	مولتی ژرم	حساس
۱۰	۳۷	هیبرید	مونوژرم	متحمل
۱۱	۴۳	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	حساس
۱۲	۴۷	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	حساس
۱۳	۵۱	تلاقی برادر و خواهر ناتنی	مولتی ژرم	حساس
۱۴	۵۵	واريته تجاری	مونوژرم	حساس
۱۵	۵۹	واريته تجاری	مونوژرم	متحمل
۱۶	۶۲	واريته تجاری	مونوژرم	حساس
۱۷	۶۳	واريته تجاری	مونوژرم	حساس
۱۸	۶۶	گرده افشان	مونوژرم	متحمل
۱۹	۷۰	گده افشان	مولتی ژرم	حساس
۲۰	۳۵	گرده افشان	مولتی ژرم	حساس

جدول ۲- فهرست و مشخصات آغازگر های SSR

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
۱	Unigene57236	5'-TTG GAG AGA GAA AAG AGA GAA G-3'	58.0
	Unigene57236	5'-ATC CCT TGA CAG TAG AAC TCC-3'	59.0
۲	Unigene77067	5'-CTT TAG TGT AGC GTT AGA GCG-3'	59.0
	Unigene77067	5'-TAA CAG CAG GAC TGG AGA AG-3'	58.0
۳	Unigene25611-F	5'-AGT TGG GGA AGA GAA A-3'	53.0
	Unigene25611-R	5'-CAC CAT ACT GAA CCT AAG A-3'	58.0
۴	Unigene11506-F	5'-GTA AAC TCG GGT AAT AAC AAG C-3'	58.0
	Unigene11506-R	5'-TAT AAG TCA TGC AGT CGA GCT A-3'	58.0
۵	Unigene17923-F	5'-AAC CTT CCC TCT GAT TTC T-3'	58.0
	Unigene17923-R	5'-GGA GAT ACA ACT TAC AAG AGC C-3'	60.0
۶	Unigene24552-F	5'-AAC ATC TCA CTC ATC CTT CTT C-3'	58.0
	Unigene24552-R	5'-ATG ATA GCA AAC GAC TAG CAG-3'	57.0
۷	Unigene22373-F	5'-AAA GGA AAC TAC CCC TAC ACT T-3'	58.0
	Unigene22373-R	5'-AAG AGA GAA AGA AGA CGA TGA G-3'	58.0
۸	Unigene17623-F	5'-ATT AGA CCT CAA TCT TCC AGC-3'	57.0
	Unigene17623-R	5'-AAT AAT GGC AAT CTA CCA GC-3'	54.0
۹	Unigene10114-F	5'-GCA AGT GGA GAA ATA TGT GAG-3'	58.0
	Unigene10114-R	5'-TAT GTG GTA GTG GTA CTG CTT-3'	60.0
۱۰	REP-F	5'-CGT AAG AGA CTA TGA-3'	41.0
	REP-R	5'-TGA ACA CCT TTC AAA-3'	40.0

(۱۲). تجزیه مولفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS به منظور بررسی نحوه پراکنش نشانگرها در سطح ژن گیاه انجام شد.

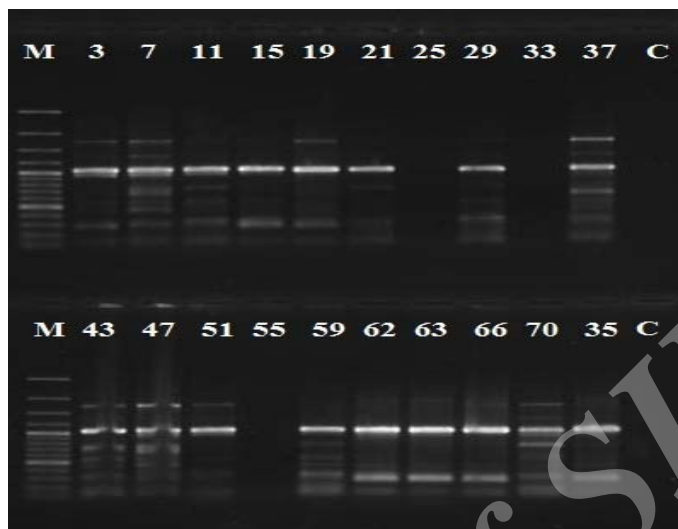
نتایج

مقاومت نژادگان چغندر قند مورد مطالعه نسبت به نماتد سیستی با استفاده از شاخص تخم و لارو، در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی شد و ژنوتیپ‌ها در سه گروه مقاوم، متحمل و حساس طبقه بندی شدند. از ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه، ۲ ژنوتیپ مقاوم، ۸ ژنوتیپ متحمل و ۱۰ ژنوتیپ حساس ارزیابی شدند (جدول ۱).

واکنش PCR با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر SSR بر روی ۲۰ نژادگان مورد مطالعه، انجام گرفت که از میان آغازگرها، ۳ جفت آغازگر 17623-R-F، 24552-R-F و 17923-R-F موفق به تولید هیچ باندهی نشدند. این در حالی است که ۷ جفت آغازگر SSR در مجموع ۴۹ قطعه چندشکل تولید

در این پژوهش برای محاسبه ضریب تشابه از سه روش محاسبه دایس با فرمول $S_{ij} = 2a/2a+b+c$ ، جاکارد با فرمول $S_{ij} = a/a+b+c$ و تشابه مقابل ساده با فرمول $S_{ij} = a+b/a+b+c+d$ استفاده شد. که در این روابط a، تک شکلی حاصل از حضور باندها، b و c جایگاه‌های ژنی چند شکل و d جایگاه ژنی تک شکل حاصل از باند صفر می باشد. همچنین با استفاده از تجزیه خوشه‌ای و دندروگرام بدست آمده، ماتریس ضرایب کوفتیک برآورد شد. سپس با نرم‌افزار NTSYS همبستگی بین این ماتریس و ماتریس تشابه اولیه محاسبه گردید. در این مطالعه نسبت چندشکلی نشانگرها با استفاده از فرمول $P = n_{pi}/n_{total}$ و پارامتر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$ محاسبه شد که در این روابط P_i و P_j به ترتیب فراوانی آلل‌های i و j در یک جایگاه ریز ماهواره می باشد (۱۴). شاخص نشانگر (MI) از رابطه $MI = PIC.N.\beta$ به دست آمد (۳)،

نمودند که تقریباً ۸۴/۵ درصد از کل ۵۸ آلل تولید شده را شامل گردید. تمامی باندها با وضوح مناسب در محدوده ۱۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز امتیازدهی شدند (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی باندهای حاصل از الکتروفورز DNAهای تکثیر شده ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند مقاوم و حساس به نماتد سیستی با جفت آغازگر REP در ژل آگارز ۳ درصد، M: مارکر وزن مولکولی 1Kb، C: کنترل منفی. اعداد اسامی ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

شاخص‌های تغییرات آلی: تعداد آللهای چندشکل در کمترین PIC مربوط به جفت آغازگر ۲۲۳۷۳ (۰/۵۸) بود. در این پژوهش بیشترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به جفت آغازگرهای REP (۸/۴۶) و ۱۰۱۱۴ (۷/۶۵) و کمترین مقدار آن مربوط به جفت آغازگر ۲۲۳۷۳ (۱/۱۶) بود (جدول ۳).

هر جایگاه ژنی از ۲ تا ۹ باند متغیر بود. حداقل این مقدار مربوط به آغازگر ۲۲۳۷۳ (۲ آلل) و حداکثر آن مربوط به آغازگرهای ۷۷۰۶۷، ۱۰۱۱۴، ۲۵۶۱۱ و REP (۹ آلل) می‌باشد. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به جفت آغازگرهای REP (۰/۹۴) و ۱۰۱۱۴ (۰/۸۵) و

جدول ۳- تعداد باندها و میزان اطلاعات چندشکلی جفت آغازگرهای SSR

ردیف	نام جفت آغازگر	تعداد آللهای	باندهای چندشکل	درصد چند شکلی	محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)	شاخص نشانگر (MI)
۱	77067	۱۱	۹	٪۸۱/۸	۰/۸۲	۷/۳۸
۲	57236	۷	۷	٪۱۰۰	۰/۷۴	۵/۱۸
۳	REP	۹	۹	٪۱۰۰	۰/۹۴	۸/۴۶
۴	11506	۸	۵	٪۶۲/۵	۰/۶۶	۳/۳
۵	22373	۴	۲	٪۵۰	۰/۵۸	۱/۱۶
۶	10114	۹	۹	٪۱۰۰	۰/۸۵	۷/۶۵
۷	25611	۱۰	۹	٪۹۰	۰/۷۳	۶/۵۷
مجموع		۵۸	۴۹	-	۵/۳۲	۳۹/۷
میانگین		۸/۲۸	۷	٪۸۴/۵	۰/۷۶	۵/۶۷

جدول ۴- مقایسه ضرایب همبستگی کوفتیک در روش‌های مختلف رسم کلاستر

الگوریتم	روش		
	دایس	جاکارد	ساده
UPGMA	۸۸/۵	۸۷/۹	۸۰/۶
UPGMC	۲۲/۲	۳۰	۲۷
Complete	۷۷/۷	۸۱/۳	۷۷/۵

جدول ۵- مقادیر ویژه، حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی براساس نشانگرهای SSR

مؤلفه اصلی	مقادیر ویژه	درصد واریانس	واریانس تجمعی
مؤلفه اول	۱/۹۵	۳۱/۹۰	۳۱/۹۰
مؤلفه دوم	۱/۳۲	۱۵/۰۵	۴۶/۹۵
مؤلفه سوم	۱/۰۱	۱۰/۰۸	۵۷/۰۳

های متحمل (۷، ۱۱، ۱۵، ۲۱ و ۳۷) به نماتد سیستی چغندر قند بود. ژنوتیپ متحل (۲۵) و دو ژنوتیپ حساس (۳۳ و ۵۵) با ۰/۹۰ درصد تشابه در گروه چهارم (IV) قرار گرفتند. در گروه دوم (II) ژنوتیپ‌های حساس (۳۵، ۷۰) و ژنوتیپ متحمل (۶۶) قرار داشتند که هر سه ژنوتیپ دارای بذر مولتی ژرم بودند و طی گرده‌افشانی حاصل شده بودند. در گروه اول دندروگرام (I) ژنوتیپ‌های حساس (۶۲ و ۶۳) و یک ژنوتیپ متحمل (۵۹) به نماتد سیستی چغندر قند قرار گرفتند که هر سه ژنوتیپ بذر مونوژرم و واریته تجاری بودند.

به منظور تعیین نحوه پراکنش نشانگرهای SSR در چغندر قند، آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام گرفت. بطوریکه سه مؤلفه اول ۵۷/۰۳ درصد از کل تغییرات را بین ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند توجیه نمودند که سهم مؤلفه اول به تنهایی ۳۱/۹ درصد، مؤلفه دوم ۱۵/۰۵ درصد و مؤلفه سوم ۱۰/۰۸ درصد از کل تغییرات را توجیه می‌کند. نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و نسبت واریانس مورد انتظار توسط سه مؤلفه اول برای هر جفت آغازگر در جدول ۵ آمده است.

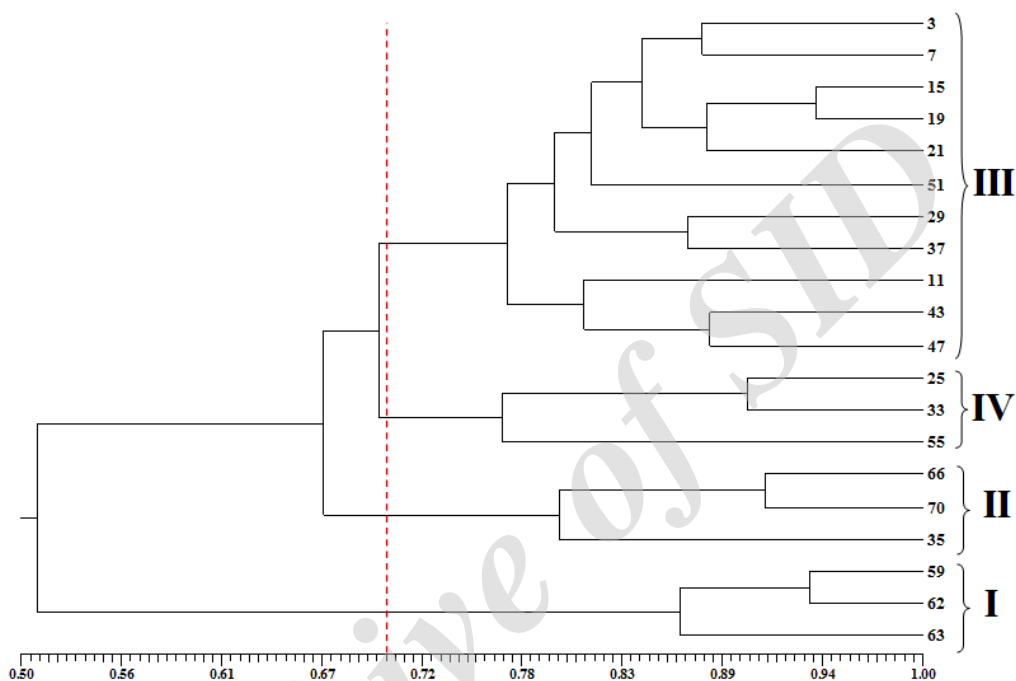
در این مطالعه نحوه گروه‌بندی تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCoA) با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای کاملاً

تجزیه خوشه‌ای: به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس فواصل ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از ماتریس تشابه دایس انجام گرفت. در واقع با توجه به اینکه در مقایسه ضرایب همبستگی، مقدار ضریب همبستگی مربوط به روش دایس از دیگر روش‌ها بالاتر بدست آمد و همچنین انطباق بالاتری بین تفکیک ژنوتیپ‌ها و اطلاعات موجود وجود داشت، تجزیه و تحلیل داده‌ها برای گروه‌بندی توده‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA انجام گرفت (جدول ۴). بطوریکه ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند مقاوم و حساس به نماتد سیستی در ضریب تشابه ۰/۷۰ به چهار زیرگروه تقسیم‌بندی شدند. ضریب همبستگی کوفتیک براساس ضریب تشابه دایس، ۰/۸۸۵ و با توجه به آزمون مانتل در سطح ۱ درصد معنی دار به دست آمد (شکل ۲).

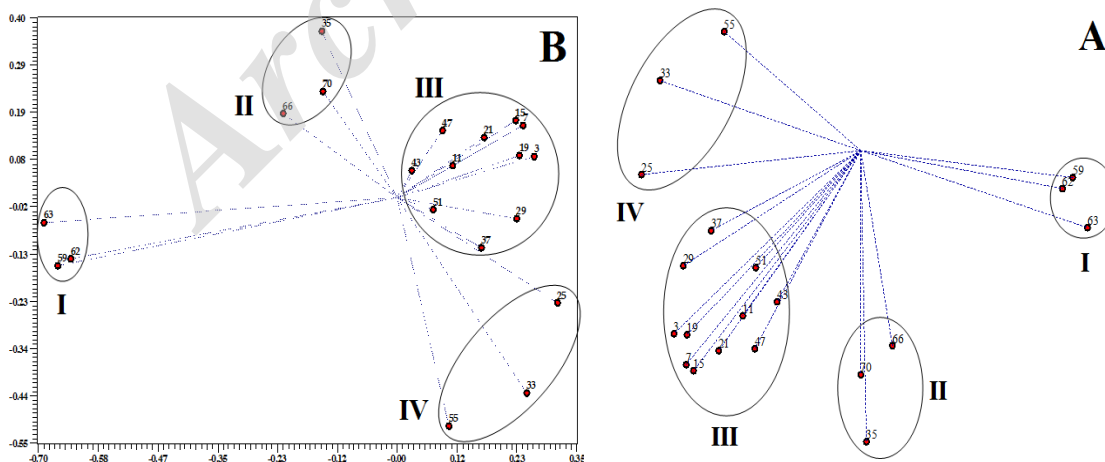
در این مطالعه جهت تفکیک و گروه‌بندی نمودار خوشه‌ای، مکان خط برش با استفاده از روش جذرگیری و میانگین ماتریس تشابه دایس بر روی محور فاصله مشخص گردید. بر این اساس خط برش نمودار خوشه‌ای را در فاصله ۰/۷۱، به ۴ زیرگروه مجزا تقسیم کرد. بطوریکه گروه سوم دندروگرام (III) بیشترین تعداد ژنوتیپ چغندر قند را در خود جای داد که خود شامل تمام ژنوتیپ‌های مقاوم (۳ و ۲۹)، ژنوتیپ‌های حساس (۴۳، ۴۷، ۱۹ و ۵۱) و ژنوتیپ-

نمودار حاصل از تجزیه مولفه‌های اصلی نیز هر دو ژنوتیپ در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. این در حالی است که ژنوتیپ ۱۵ (متحمل) با ۹۴ درصد تشابه فاصله ژنتیکی کمی با ژنوتپ ۱۹ (حساس) کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. (شکل ۳).

مطابقت داشت. بطوریکه تعداد زیرگروه‌های به دست آمده در گروه‌بندی تجزیه مولفه‌های اصلی با زیرگروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای مشابهت کامل دارد. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو ژنوتیپ ۲۵ (متحمل به نماتد) و ۶۳ (حساس به نماتد) با ۳۳ درصد تشابه مشاهده شد. در گروه‌بندی خوشه‌ای و



شکل ۲- دندروگرام حاصل از پلی‌مورفیسم ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند مقاوم و حساس به نماتد سیستی با جفت آغازگرهای SSR



شکل ۳- نمودار سه بعدی (A) و دوبعدی (B) داده‌های حاصل از تجزیه مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تشابه دایس برای ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند مقاوم و حساس به نماتد سیستی

بحث

تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ژنی در این مطالعه می‌تواند بیانگر تنوع بالاتر توده‌های استفاده شده باشد. همچنین PIC بالاتر در این مطالعه، بیانگر قدرت تمایز بیشتر نشانگرهای SSR استفاده شده در این مطالعه است. با توجه به اینکه جفت آغازگرهای REP و 10114 دارای بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر بودند، علاوه بر آن چندشکلی بسیار بالایی (۱۰۰ درصد) نشان دادند، بنابراین می‌توان آن‌ها را به عنوان جفت آغازگرهای مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چغندرقد مقاوم و حساس به نماتد سیستی معرفی و انتخاب کرد.

از طرفی بر اساس آزمون تجزیه مولفه‌های دو مولفه اول ۴۶/۹۵ درصد از کل تغییرات را بین ۲۰ ژنوتیپ چغندرقد توجیه نمودند. توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط چند مولفه اول، دلیل بر توزیع مناسب جفت آغازگرهای بکار رفته بر روی ژنوم می‌باشد و بیان می‌کند که آغازگرها در یک قسمت ژنوم متمرکز نشده‌اند.

همچنین نتایج این مطالعه بیانگر تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه بین ژنوتیپ‌ها بود ولی با توجه به نتایج بدست آمده از دندروگرام ژنوتیپ‌ها می‌توان استنباط کرد که تنوع ژنتیکی ایجاد شده رابطه مستقیمی با مقاوم یا حساس بودن ژنوتیپ‌ها ندارد. در واقع با توجه به بررسی‌های انجام شده در خصوص وجود تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقد با نشانگر SSR مشخص گردید که ژنوتیپ‌های چغندرقد از نظر ژنتیکی بر اساس طیف‌های مختلف مقاومت، حساسیت و متحمل بودن به بیماری نماتد سیستی در گروه‌های مجزا قرار نگرفتند و همبستگی قابل توجهی را نشان ندادند. مقاوم یا حساس بودن گیاه چغندرقد می‌تواند تحت تأثیر یک یا چند ژن خاص باشد که لزوماً وجود یا عدم وجود این ژن‌ها باعث تشابه ژنتیکی و یا عدم تشابه ژنوتیپ‌ها با یکدیگر نمی‌شود.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SSR به خوبی در سطح ژنوم پراکنده شده‌اند و کارایی مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چغندرقد مقاوم و حساس به نماتد سیستی دارند. تولید تعداد باند زیاد و میزان چندشکلی بالا در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان دهنده کارایی بالای نشانگرهای SSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های چغندرقد مقاوم و حساس به نماتد سیستی بود.

در این مطالعه هفت نشانگر SSR توانستند ۵۸ آلل با دامنه ۴ تا ۱۱ آلل در هر مکان ژنی را شناسایی کنند که متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر جفت آغازگر ۷ باند بود. در این تحقیق محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر جفت آغازگر SSR نیز محاسبه شد. بیشترین PIC مربوط به جفت آغازگرهای REP و 10114-R-F به ترتیب ۰/۹۴ و ۰/۸۵ و کمترین PIC مربوط به جفت آغازگر 22373-R-F با مقدار ۰/۵۸ بود. میانگین PIC برای کل جفت آغازگرها بالا (۰/۷۶) بود. عباسی و همکاران (۱) در مطالعه خود بر روی تنوع ژنتیکی ۱۶۸ ژنوتیپ چغندرقد با استفاده از ۱۸ نشانگر SSR گزارش کردند که دامنه تعداد آلل به ازای هر جفت آغازگر ۲-۱۰ و متوسط آن ۵/۷ آلل بود. همچنین دامنه PIC از ۰/۳۶ تا ۰/۸۳ متغیر و میانگین PIC ۰/۶۴ بود. در تحقیق اسمولدر و همکاران (۱۵) بر روی بررسی خصوصیات واریته‌های چغندرقد با ۲۵ نشانگر ریزماهواره تعداد آلل‌ها از ۳ تا ۲۱ آلل متغیر بود و واریته‌ها تا حدود ۷ آلل مختلف را در یک مکان ژن برای هر نشانگر نشان دادند.

هر چه عدد متوسط تعداد قطعه چندشکل و محتوای اطلاعات چندشکلی به ازای هر جفت آغازگر بیشتر باشد کارایی آن نشانگر در گیاه مورد مطالعه بالاتر است و نمایانگر قدرت تمایز بیشتر نشانگر می‌باشد. بیشتر بودن

منابع

- 1- Abbasi, Z., Arzani, A., and Majidi, M. M. 2014. Study of adaptability and stability of sugar beet monogerm cultivars in different locations of IRAN. *Sugar beet*, 24(2), 1-11.
- 2- Akhyani, A., Damadzadeh, M., and Ahmadi, A.R. 2000. Distribution and infestation rate of *Heteadera schachtii* in sugarbeet fields of Esfahan province. *Sugar beet*, 68(1), 137-142.
- 3- Anderson, JA, Churchill, GA, Autrique, JE, Tanksley, SD, and Sorrells, ME. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36(1), 181-186.
- 4- Behdad, E. 2006. *Phytopathology And Important Plant Disease*. Iran. Tehran: Atr-e-Etrat Publication.
- 5- Desplanque, B, Boudry, P, Broomberg, K, Saumitou-Laprade, P, Cuguen, J, and Van Dijk, H. 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(8), 1194-1201.
- 6- Ganesh, CT, Gowda, RV, Narayanaswamy, P, Gowda, PHR, Keshavachandran, R, Nazeem, P, . . . Peter, KV. (2007). Development of protocols for DNA extraction and amplification in onion (*Allium cepa* L.) for RAPD analysis. Paper presented at the Recent trends in horticultural biotechnology, Vol. II. ICAR national symposium on biotechnological interventions for improvement of horticultural crops: issues and strategies, Vellanikkara, Kerala, India, 10-12 January, 2005.
- 7- Laurent, V, Devaux, P, Thiel, T, Viard, F, Mielordt, S, Touzet, P, and Quillet, MC. 2007. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome. *Theoretical and applied genetics*, 115(6), 793-805.
- 8- Maafi, Zahra Tanha, Subbotin, Sergei A, and Moens, Maurice. 2003. Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. *Nematology*, 5(1), 99-111.
- 9- Mahuku, George S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 71-81.
- 10- Müller, Joachim. 1998. New pathotypes of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) differentiated on alien genes for resistance in beet (*Beta vulgaris*). *Fundamental and applied nematology*, 21(5), 519-526.
- 11- Norouzi, P. 2003. The Simple and effective method for Genomic DNA extraction from plant an Fungus for PCR-based analyses. *Sugar beet*, 19(2), 175-176.
- 12- Powell, Wayne, Morgante, Michele, Andre, Chaz, Hanafey, Michael, Vogel, Julie, Tingey, Scott, and Rafalski, Antoni. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225-238.
- 13- Powers, Thomas O, Todd, TC, Burnell, AM, Murray, PCB, Fleming, CC, Szalanski, Allen L, . . . Harris, TS. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4), 441.
- 14- Prasad, M, Varshney, RK, Roy, JK, Balyan, HS, and Gupta, PK. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3-4), 584-592.
- 15- Smulders, MJM, Bredemeijer, G, Rus-Kortekaas, W, Arens, P, and Vosman, B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(2), 264-272.
- 16- Srivastava, Sangeeta, Gupta, Prashant S, Saxena, Vimal Kumar, and Srivastava, Hari Mohan. 2007. Genetic diversity analysis in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) using isozymes, RAPD and ISSR markers. *Cytologia*, 72(3), 265-274.
- 17- Whitney, ED, and Duffus, James E. 1986. *Compendium of beet diseases and insects* (Vol. 76). St. Paul Minnesota: APS press.
- 18- Zhang, C-L, Xu, D-C, Jiang, X-C, Zhou, Y, Cui, J, Zhang, C-X, . . . Scott, Nigel W. 2008. Genetic approaches to sustainable pest management in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Annals of Applied Biology*, 152(2), 143-156.

Assessment of Genetic Diversity among Resistant and Susceptible Sugar Beet Genotypes to Cyst Nematode using SSR molecular markers

Askarinejad P.¹, Vatandoost J.² and Nasr M.³

¹ Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Sabzevar, I.R. of Iran

² Biology Dept., Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

³ Isfahan Agricultural and Natural Resources Research Center, (AREEO), Plant Pest and Diseases Research Institute, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is a dicotyledonous and two years plant from Chenopodiaceae family and its economic importance is due to unique ability to produce high amounts of sugar. Sugar beet cyst nematode is the most important disease in the area under cultivation of this product. So this study was performed to assess the genetic diversity of 20 genotypes resistant and susceptible nematode using SSR markers. Following DNA extraction, PCR amplification was performed using 10 pairs of SSR primers and 49 polymorphic bands were selected from 7 pairs. The highest of Polymorphism Information Content (PIC) and highest Marker Index (MI) related to REP primer pairs and 10114 respectively. Cluster analysis using NTSYS software with UPGMA method based on Dice's similarity matrix divided genotypes into 4 clusters. The highest genetic similarity between tolerant and susceptible sugar beet cyst nematode was found. According to the results, it can be concluded that genetic variation does not have a direct relationship with resistant or sensitive genotypes. In fact, it was found that genotypes of sugar beet based resistance spectrum, sensitivity and tolerance to nematode disease were not in separate groups and a significant correlation was not observed.

Key words: *Beta vulgaris*, Genetic Diversity, SSR Marker, Cyst Nematod