



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

حمیده کیخسروی<sup>۱</sup>، مسعود دهداری<sup>۲\*</sup>، اسد معصومی اصل<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران.

<sup>۳</sup> استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۲

### چکیده

چغندرقد 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. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۰ ژنوتیپ چغندرقد، 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 به دست آمده در ژنوتیپ‌های چغندرقد 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 (۴/۳۲) 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 ۴ گروه اصلی قرار داد. براساس نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی، سه مولفه اول به ترتیب ۷۲/۶۷، ۵/۹۹ و ۴/۰۵ 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 چغندرقد استفاده نمود.

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

## مقدمه

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 به کار می‌روند (Babajanpour *et al.*, 2009; Barzan *et al.*, 2016). با توجه به موارد فوق‌الذکر برآورد تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقد 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 تأثیر 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 گرفته است. هرچند از RAPD و SSR در چغندرقد برای شناسایی و نقشه‌برداری ژرم‌پلاسم نیز استفاده شده است (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

چغندرقد 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 چغندرقد، بسته به شرایط محیطی و ژنوتیپ، از ۵ تا ۹ ماه متغیر می‌باشد و به عنوان گیاهی دیررس شناخته می‌شود (Khajehpor, 2011). چغندرقد یکی از دوازده گیاه اصلی است که غذای مردم جهان را تأمین می‌کند و از نظر ارزش غذایی در ردیف برنج، ذرت، گندم، سیب زمینی و حبوبات قرار می‌گیرد. قند یکی از عمده‌ترین و ارزان‌ترین مواد غذایی است و به عنوان سرچشمه انرژی محسوب می‌شود. ساکارز تهیه شده از چغندرقد یک مکمل غذایی در سراسر جهان است که حدود ۳/۱ ساکارز جهان را شامل می‌شود (Basati, *et al.*, 2003). منابع ژنتیکی گیاهی، علاوه بر زیربنای توسعه کشاورزی، به عنوان منبعی از سازگاری ژنتیکی، همچون سپری در برابر تغییرات محیطی عمل می‌کنند. این منابع تأمین‌کننده مواد خام ژنتیکی هستند که در صورت 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

۱۲ والد چغندر قند استفاده کردند. تجزیه خوشه-ای ژنوتیپ‌های گرده‌افشان را از ژنوتیپ‌های نرعیقیم تفکیک نمود. در مطالعه دیگر *Li et al.* (2010) تنوع ژنتیکی ۱۱۱ اینبرید لاین حاصل از بذور و ۱۷۸ اینبرید لاین حاصل از دانه‌گرده را به کمک نشانگر SSR بررسی کردند. آنها دو زیر گروه کاملاً مشخص در کل ژرم‌پلاسِم معرفی کردند. اینبرید لاین‌های حاصل از بذور از نظر گروه-های هترو تیک متفاوت از اینبرید لاین‌های حاصل از دانه‌گرده بودند. با وجود مطالعات گسترده‌ای که روی بررسی تنوع ژنتیکی چغندر قند 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.*, 2015; *et al.*, 2011)، به همین دلیل این مطالعه با بکارگیری ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند و ۲۰ آغازگر ISSR طراحی گردید.

#### مواد و روش

به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی میان ۲۰ ژنوتیپ مختلف چغندر قند (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

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 چغندر قند نیز در چند مطالعه استفاده شده است. *Srivastara et al.* (2007) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت دیپلوئید چغندر قند 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 ۰/۴۱ و ۰/۴۴ 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) ۱۲ نشانگر SSR را برای توصیف ۴۰ واریته دیپلوئید و تریپلوئید چغندر قند 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 ۱۶۸ ژنوتیپ حاصل از

PC 2.02 و Popgen32 صورت پذیرفت (Francis *et al.*, 1999). شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی PIC با استفاده از فرمول  $PIC = 1 - \sum P_i^2$  محاسبه شد (Botstein *et al.*, 1980). در این فرمول  $P_i$  فراوانی آلل  $i$  م در یک مکان مشخص می‌باشد. با توجه به ضریب همبستگی کوفتیکی 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.

و تهیه بذر چغندر قند کرج تهیه شدند. برای تهیه نمونه‌های برگ، از هر رقم ۱۲ عدد بذر در گلدان کاشته شد و پس از گذشت چهار هفته نمونه‌های برگ گیاهچه‌های جوان تهیه و به فریزر  $-40^{\circ}\text{C}$  درجه‌سانتی‌گراد منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در این دما نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش Murray & Thompson (1980) انجام گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری 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 پلیمرز 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 پلیمرز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵ درصد) Top vision آشکارسازی شد. رنگ آمیزی ژل‌ها با اتیدیوم بروماید ( $1\mu\text{g/ml}$ ) 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 نوادهی امتیازبندی شدند. تجزیه و تحلیل مشاهدات با استفاده از نرم افزارهای NTSYS

جدول ۱ - مشخصات ژنوتیپ‌های چغندر قند مورد مطالعه.

**Table 1- Description of the studied sugar beet genotypes.**

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

مقدار ۰/۳۸ و کمترین آن مربوط به مکان ژنی UBC847 به مقدار ۰/۱۳ بود (جدول ۴). 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).

بجز نوارهای حاصل از آغازگرهای UBC834، UBC835، UBC845، UBC847، UBC848 و UBC851 نوارهای سایر آغازگرها ۱۰۰ درصد چندشکل نشان دادند (جدول ۳). از کل ۱۴۹ نوار تولید شده ۱۵ نوار تک شکل (منومورف) و ۱۳۴ نوار از آنها چندشکل بودند. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به مکان ژنی UBC853 به

جدول ۲- مشخصات ۲۰ آغازگر ISSR مورد مطالعه.

Table 2- Description of the 20 studied ISSR markers.

شماره	آغازگر	توالی آغازگر 5' → 3'	دمای اتصال (سلسیوس)
No.	Primers	Sequences (5' → 3')	Annealing temperature (Celsius)
1	UBC814	CTCTCTCTCTCTCTA	44.6
2	UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	47.1
3	UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG	47.1
4	UBC826	ACACACACACACACC	47.1
5	UBC827	ACACACACACACACG	47.1
6	UBC830	TGTGTGTGTGTGTGG	47.1
7	UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAYT	48
8	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAYC	48
9	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	48
10	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAT	44.6
11	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG	48
12	UBC847	CACACACACACACACRC	48
13	UBC848	CACACACACACACARG	48
14	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGYG	48
15	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCRT	48
16	UBC855	ACACACACACACACACYT	48
17	UBC856	ACACACACACACACACYA	48
18	UBC857	ACACACACACACACACYG	48
19	UBC859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	48
20	UBC864	ATCATGATGATGATGATG	41.2

بیشتر از نشانگرهای آیزوزایم است. مقدار PIC تابعی از تعداد و فراوانی آلل است. بیشترین میزان شاخص شانون مربوط به مکان UBC830 (۴/۳۲) که نشان دهنده تنوع جمعیتی است، بود. همچنین مکان UBC847 دارای کمترین میزان شاخص شانون (۰/۵۸) بود (جدول ۴). 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

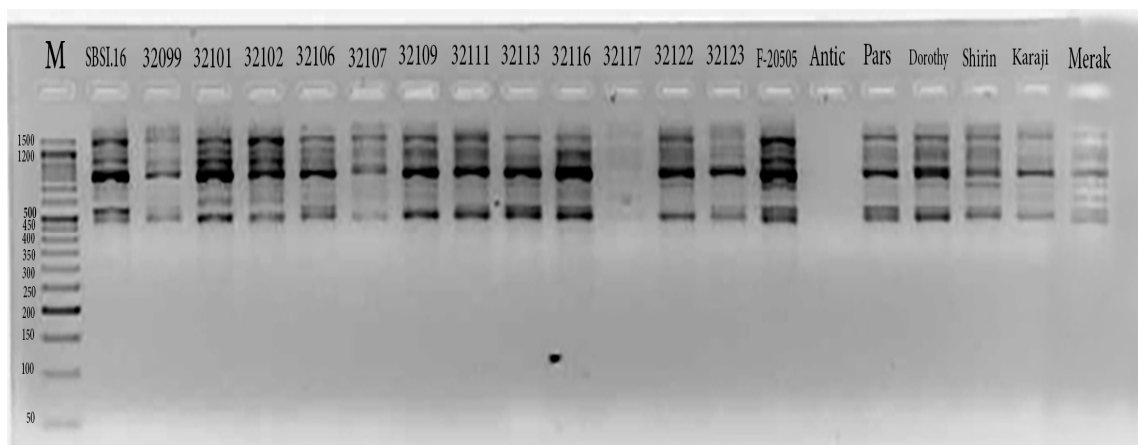
مقدار PIC در نشانگرهای UBC834 و UBC848 برابر ۰/۱۹ بود، دلیل کم بودن این مقدار در نشانگرها، ممکن است به علت نرخ جهش بالاتر در توالی‌های تکراری دی نوکلئوتیدی باشد (Vigoruroux *et al.*, 2005). در توافق با این پژوهش Srivastara *et al* (2007) مقدار PIC را در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام چغندر قند بوسیله نشانگر ISSR ۰/۴۴ گزارش کردند. آنها اثبات نمودند که کارایی نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی چغندر قند

سایر نشانگرها بخصوص SSR هم در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چغندر قند استفاده شده است که همانند مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی وسیعی گزارش شده است (Smulders, et al., 2010; Abassi, et al., 2014; Li, et al., 2010).

دامنه ضریب تشابه بدست آمده از نشانگر ISSR در این تحقیق از ۰/۱۴ بین دو رقم مراک و آنتیک تا ۰/۹۳ بین دو رقم ۳۲۱۰۹ و ۳۲۱۰۶ 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 ۰/۴۳ تا ۰/۸۳ بود 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.

دیگر این آغازگرها تنوع و چند شکلی زیادی را در ژنوتیپ‌های دیگر چغندر قند نشان داده‌اند. مثلا در بررسی ده رقم و لاین چغندر قند 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 ۴۲ توده چغندر قند 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 به وسیله هر دو نشانگر گزارش شد، که این نشان داد دو نشانگر برای شناسایی تنوع ژنتیکی در توده‌های چغندر قند مناسب هستند. در مطالعه آنها دندروگرام حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR نشان داد که هر دو گروه بندی 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، انگشت نگاری 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



شکل ۱- الگوی نواری آغازگر UBC840 در ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند (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 (agarose 1.5 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 ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی آغازگرهای ISSR در ژنوتیپ‌های چغندر قند

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

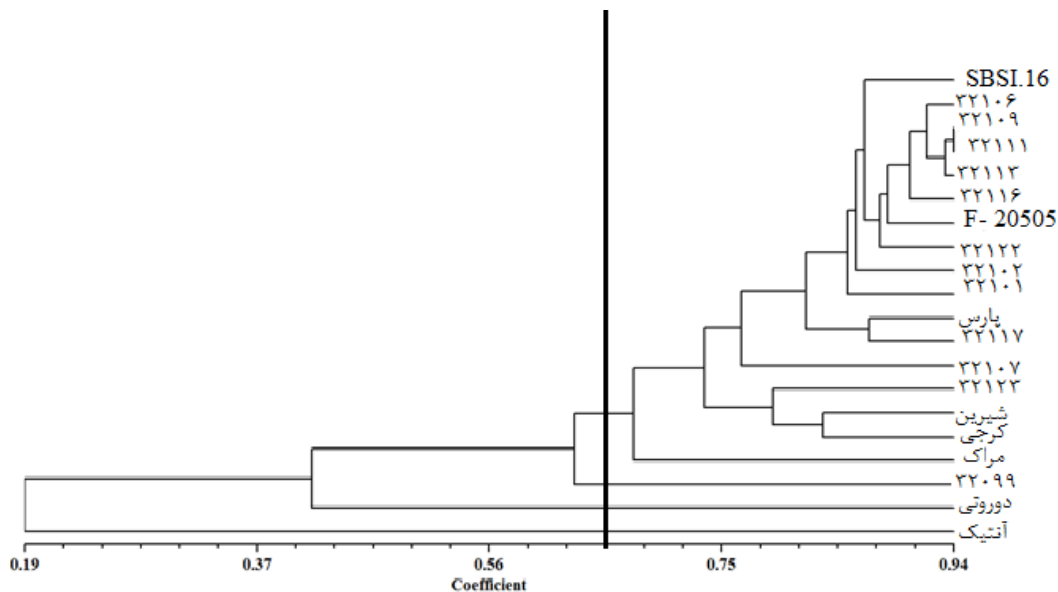
ردیف	آغازگر	محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC)	شاخص شانون
No.	Primer	Polymorphism content information	Shannon index
1	UBC814	0.33	2.65
2	UBC823	0.23	2.54
3	UBC824	0.19	0.79
4	UBC826	0.13	1.36
5	UBC827	0.31	3.22
6	UBC830	0.29	4.32
7	UBC834	0.19	2.43
8	UBC835	0.27	3.74
9	UBC840	0.24	3.82
10	UBC842	0.22	2.39
11	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

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 چغندر قند می‌باشد. از بررسی‌های انجام شده برای گروه‌بندی ارقام مورد آزمایش چغندر قند 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

گروه‌بندی ارقام براساس مشاهدات مولکولی براساس دندروگرام حاصل از نشانگر مولکولی ISSR، ۲۰ رقم چغندر قند در ۴ گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۲). نتایج حاصل نشان داد که ارقام FSBI.16، ۳۲۱۰۶، ۳۲۱۰۹، ۳۲۱۱۱، ۳۲۱۱۳، ۳۲۱۱۶، 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. عبارت دیگر از نظر نشانگرهای بکار رفته بیشترین تنوع مشاهده شده میان این سه رقم با

دور از هم قرار گرفته‌اند، نتایج 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.

نشان دهنده روابط بین ارقام چغندر قند مورد بررسی هستند، ممکن است در برنامه‌های اصلاحی چغندر قند 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



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.

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

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

در اکثر مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی بوسیله نشانگرهای مولکولی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نیز صورت می‌گیرد. هدف اصلی در اینجا انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای ادامه کارهای اصلاحی می‌باشد. در این راستا ژنوتیپ‌هایی انتخاب می‌شوند 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

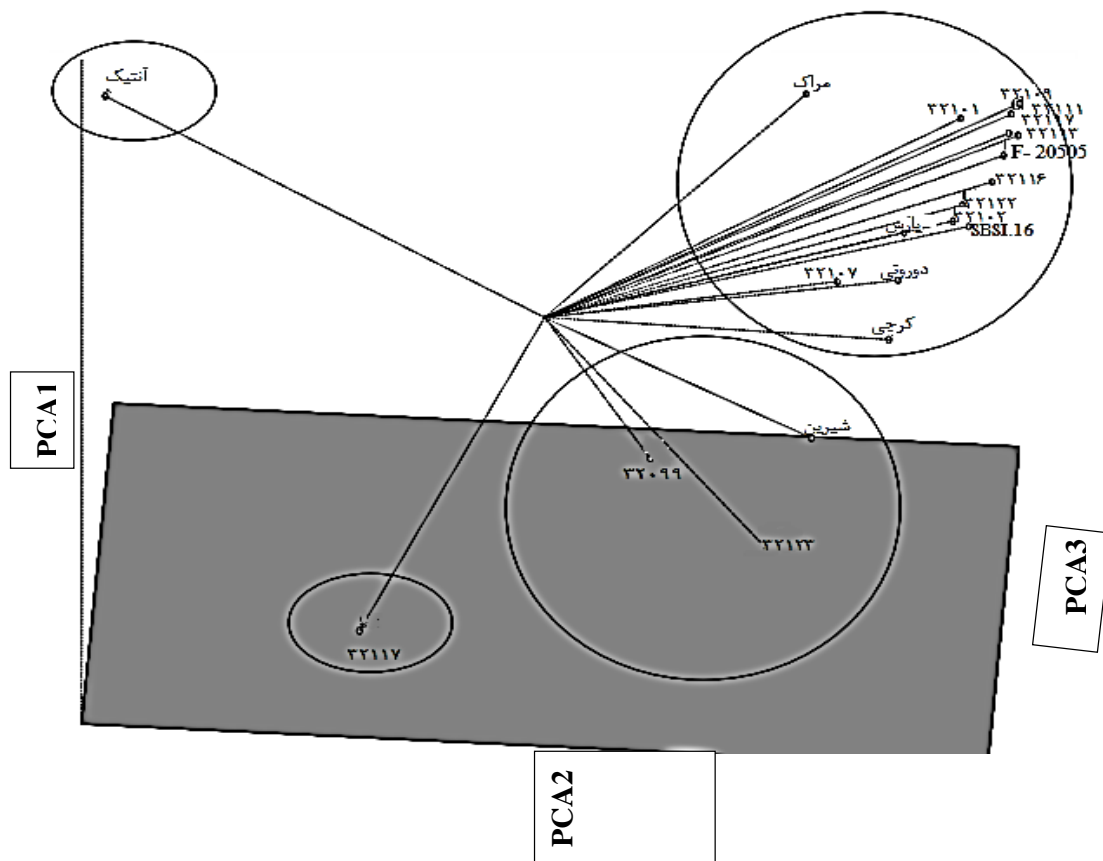
نگارندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر چغندر قند بدلیل در اختیار گذاشتن مواد گیاهی بعمل می‌آورند.

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).

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

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

مؤلفه‌ها 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 مؤلفه 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). Poptgene 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](http://ftp.microsoft.com/Softlib/Mslfiles).
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010). Determination of genetic 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). Efficiency 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, Thompson 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 Yunnan 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 sheep using 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.<sup>1</sup>, Dehdari M.\*<sup>2</sup>, Masoumiasl A.<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Graduate student of plant breeding, University of Yasouj, Iran.<sup>2</sup>Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Iran.<sup>3</sup>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