ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۱۴ - ۲۰۵

شناسایی گیاهان متحمل و حساس به خشکی در هیبریدهای چغندرقند با استفاده از نشانگرهای SSR و RAPD مرتبط با آن

Identification of drought tolerant plants in sugar beet using related SSR and RAPD markers

سعیده قنبری[۱]، نسرین مشتاقی*[۲]، مسعود احمدی[۳]، امین میرشمسی کاخکی[۲]

۱- کارشناسی ارشد، اصلاح نباتات، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- عضو هیات علمی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- عضو هیات علمی، بخش تحقیقات چغندرقند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

Ghanbari S[1], Moshtaghi N[*2], Ahmadi M[3], Mirshamsi Kakhki A[2]

1- BSc of Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad
2- Faculty of Agriculture, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad
3- Associate Professor, Sugar Beet Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moshtaghi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که تولید محصولات زراعی را در جهان محدود کرده است. شناسایی ژنوتیپ‌های برتر محصولات زراعی خصوصاً از نظر تحمل به خشکی، گام مهمی در برنامه‌های به نژادی می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر سبب کاهش مدت زمان اصلاح و هزینه پروژه‌های اصلاحی می‌شود. در این تحقیق ۲۰ هیبرید چغندرقند برای بررسی تنوع با ۱۰ آغازگر SSR و ۹ آغازگر RAPD و تعیین ارتباط این تنوع با خشکی استفاده شدند. پس از تکثیر قطعات با استفاده از آغازگرها، الگوی نواربندی با یک و صفر نشان داده شدند و تجزیه‌های آماری صورت گرفت. شاخص‌های بررسی تنوع ژنتیکی نشان داد که بیشترین تنوع در آغازگر SSR و RAPD به‌ترتیب مربوط به آغازگر BQ583448 (۷۶٪) و آغازگر J (۴۴٪) بود. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام شد. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته بر روی تجزیه‌ی خوشه‌ای شاخص STI (Stress Tolerance Index) (حاصل مطالعات قبلی) و نشانگرهای مولکولی استفاده شده، مشاهده شد که از میان‌های نشانگرهای SSR استفاده شده در این تحقیق، آغازگر BQ583448 و آغازگر FDSB502 و از میان نشانگرهای RAPD، آغازگرهای J و A سبب تفکیک ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی شدند. بررسی تنوع ژنتیکی از نظر تحمل به خشکی با نشانگر SSR تا حدودی مفید بوده و این نشانگر می‌تواند در برنامه‌های بهبود تحمل به خشکی در چغندرقند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
چغندرقند
خشکی
نشانگر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]

مقدمه

تنش خشکی یکی از عوامل تهدید اصلی برای کاهش عملکرد اغلب محصولات زراعی است. در این بین چغندرقند نیز متأثر از تنش خشکی در اغلب مناطق ایران است و این تنش می‌تواند عملکرد ریشه و عملکرد قند را تحت تأثیر قرار دهد، لذا توسعه واریته‌های متحمل به خشکی در این گیاه از نظر اصلاحی حائز اهمیت است (Bellard et al. 2012). برای توسعه‌ی گیاهان زراعی با افزایش تحمل به تنش خشکی، درک مناسبی از تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی در گیاهان ضروری است. انتخاب ارقام مقاوم و یا متحمل بر اساس صفات فنوتیپی به کندی انجام می‌گیرد اما با نشانگرهای مولکولی شناسایی شده، تسریع می‌شود (Degenkolbe et al. 2013). تهیه ارقام متحمل به‌خشکی، مستلزم شناسایی اساس ژنتیکی و جایگاه ژنومی (QTL) صفات مرتبط با تحمل به خشکی می‌باشد. چغندرقند با نام علمی *Beta vulgaris* گیاهی دو ساله از خانواده اسفناجیان است که از مهم‌ترین گیاهان صنعتی و جزو دو منبع مهم گیاهی تأمین کننده شکر به‌صورت اقتصادی است (Joersbo 2007). طول دوره رشد چغندرقند، بسته به شرایط محیطی و ژنوتیپ، از ۵ تا ۹ ماه متغیر بوده و به‌عنوان گیاهی دیررس و روز بلند محسوب می‌شود (Cooke et al. 1997). مطالعات متعددی در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگرهای مولکولی در چغندرقند انجام شده است. در پژوهشی که به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۳ ژنوتیپ چغندرقند با استفاده از ۱٤ آغازگر SSR انجام شد، مشخص شد که ۱٤ آغازگر، ۸۸ باند را با دامنه اندازه‌های ۱۲٤ تا ۱۲۲۲ جفت‌باز با محدوده‌ی PIC زیاد و کم (۰/۸۵، ۰/٦۲۵) تولید کردند (Srivastava et al. 2017). Ćurčić et al. (2017) بر روی تنوع ژنتیکی و ارتباط آن با گرده افشانی در چغندرقند با استفاده از نشانگر SSR تحقیقی انجام دادند. در بررسی آن‌ها حدود ۱٤۰نمونه از ۱۲ لاین شامل لاین‌های بارور و نرعقیم سیتوپلاسمی استفاده شدند، در کل ۱۲۹ باند با میانگین ۲ تا ۳ باند در هر نشانگر SSR به‌دست آمد. در بررسی آن‌ها ۷۷/٤٤ درصد از کل تغییرات ژنتیکی به تنوع درون جمعیتی مربوط بود که از این تنوع ژنتیکی می‌توان در برنامه‌های اصلاحی بهره برد. در پژوهشی دیگر که به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۲۰ ژنوتیپ چغندرقند از ۲۰ آغازگر ISSR استفاده نمودند. بعد از استخراج DNA و تکثیر قطعات با استفاده از آغازگرهای ISSR، باندهای حاصله امتیازبندی شدند و تجزیه‌های آماری انجام گرفت. بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به مکان آغازگر UBC 853 (۰/۳۸) و کمترین میزان PIC مربوط به آغازگر UBC 847 (۰/۱۳) بود (Keykhosravi 2017). مطالعه‌ی Deshmukh et al. (2012) برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در میان ارقام دیم و ارقام آبی گندم با توجه به صفت تحمل به خشکی انجام شد و به‌ترتیب ۱٤و۹۰ نشانگر RAPD و ISSR برای شناسایی این نواحی ژنومی مورد استفاده قرار گرفت. از ۱٤ آغازگر RAPD ، یک آغازگر RAPD با پلی‌مورفیسم ۱۸/٦ درصد برای تفکیک ارقام حساس و متحمل به خشکی شناسایی شد. از ۹۰ آغازگر ISSR، فقط ۳ آغازگرISSR، پلی‌مورفیسم را در ارتباط با ویژگی تحمل به خشکی نشان دادند و پلی‌مورفیسم ۲۱/۳۸ درصد را نشان دادند. درمطالعه‌ی ElSayed and Rafudeen (2012) برای تعیین تفاوت ژنتیکی و ارزیابی تحمل به خشکی بین پنج ژنوتیپ گندم از نشانگر RAPD به‌عنوان یک ابزار تشخیص تحمل به خشکی استفاده شد. در مجموع۷۲ باند با استفاده از ٦ آغازگر RAPD ارزیابی شدند که٦۱ درصد آن‌ها مونومورف و ۳۸ درصد پلی‌مورف بودند و ژنوتیپ Sham-6 با داشتن باند ٦۰۰ bp با آغازگر PrimerB8 به‌عنوان ژنوتیپ متحمل به خشکی معرفی شد. در مطالعه‌ی Ahmadi et al. (2011) بر روی میزان تحمل به خشکی در لاین‌های گرده افشانS1 از یک جمعیت آزادگرده افشان چغندرقند، از ۷٦ لاین S1 (دارای خویش آمیزی) چغندرقند استفاده شد. تست کراس بین لاین‌های تولید شده به‌عنوان پایه گرده افشان و هیبرید ساده (سینگل کراس) نر عقیم سیتوپلاسمی انجام شد. نتایج حاصل ازاین هیبریدها در دو آزمایش متوالی تحت تنش خشکی و بدون تنش خشکی بررسی شدند و تفاوت عملکرد ریشه و عملکرد شکر تحت هر دو شرایط بررسی شد. آن‌ها گزارش کردند که بین تست کراس‌های چغندرقند تنوع برای تحمل به‌خشکی وجود دارد و این تنوع به‌دلیل تنوع در لاین‌های پدری گرده افشان است. لذا در بررسی حاضر در ادامه مطالعه Ahmadi et al. (2018) از نشانگرهای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]

مولکولی نظیر RAPD و SSR برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با تحمل به خشکی در این هیبریدها استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۰ ژنوتیپ چغندرقند شامل ۱۶ هیبرید تاپ کراس و ٤ هیبرید تجاری به‌عنوان شاهد استفاده شد (جدول۱). این ژنوتیپ‌ها درمرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی بخش تحقیقات چغندرقند ازنظر تحمل به خشکی در مطالعه Ahmadi et al. (2018) مورد ارزیابی قرار گرفته بودند و از شاخص تحمل به خشکی STI (Stress Tolerance Indix)، برای تعیین تحمل ژنوتیپ‌های چغندرقند استفاده شده بود. در بررسی آن‌ها میزان عملکرد ژنوتیپ‌ها در دو شرایط نرمال و تحت تنش به‌همراه محاسبه شاخص تحمل به خشکی STI تعیین شد. شاخص STI یکی از مناسب‌ترین شاخص‌هایی است که برای گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم یا حساس استفاده می‌شود (Fernandez 1992). لازم به ذکر است که مراحل اجرای تنش به این صورت بوده که بعد از مرحله تنک براساس میزان تبخیر آب از تشتک تبخیر، آبیاری در شرایط نرمال و تنش انجام شد. در شرایط نرمال پس از ۹۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک، آبیاری انجام می گرفت و در شرایط تنش پس از ۲۰۰میلی‌متر تبخیر از تشتک، آبیاری انجام شد. در تحقیق حاضر۲۰ ژنوتیپ چغندرقند با استفاده از ۱۰ آغازگر SSR (جدول۲) و ۹ آغازگر RAPD (جدول۳) برای شناسایی نشانگرهای احتمالی مرتبط با صفت تحمل و یا حساسیت به خشکی مورد استفاده قرار گرفتند. در این تحقیق شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول $PIC= 1 - \Sigma pi^2$ محاسبه شد (Botstein et al. 1980) و همچنین تجزیه به مختصات اصلی که روشی برای نمایش دو بعدی پراکنش اعضاء می‌باشد، نیز انجام شد. آغازگرهای استفاده شده بر اساس مقالات علمی که در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی و یا تعیین ارتباط نشانگرها با صفت تحمل به خشکی انجام گرفته بودند، انتخاب شدند. در ابتدا برگ نمونه‌های هیبرید برداشت شده و پس از فریز کردن در ازت مایع به فریزر ۸۰- جهت نگهداری منتقل شدند. به‌منظور استخراج DNA از روش CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید) استفاده شد و برای بررسی کیفیت و کمیت DNAی استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری شرکت Thermo Scientific (USA) استفاده شد. با توجه به مطالعه Ćurčić et al. (2017) از آغازگرهای SSR (جدول ۲) که دارای میزان چند شکلی یا درصد پلی‌مورفیسم بالایی در گیاه چغندرقند بودند و همچنین از آغازگرهای RAPD استفاده شد (جدول۳).

جدول ۱- هیبریدهای چغندرقند مورد استفاده در آزمایش

نام هیبرید	نام والدین	ردیف	نام هیبرید	نام والدین	ردیف
Hybrid 66	CMS ×Pollinator 66	11	Hybrid 3	CMS ×Pollinator 3	1
Hybrid 70	CMS ×Pollinator 70	12	Hybrid 8	CMS ×Pollinator 8	2
Hybrid 71	CMS ×Pollinator 71	13	Hybrid 13	CMS ×Pollinator 13	3
Hybrid 72	CMS ×Pollinator 72	14	Hybrid 15	CMS ×Pollinator 15	4
Hybrid 73	CMS ×Pollinator 73	15	Hybrid 16	CMS ×Pollinator 16	5
Hybrid 100	CMS ×Pollinator 100	16	Hybrid 18	CMS ×Pollinator 18	6
SBSI7	شاهد رقم جلگه (هیبرید تجاری)	17	Hybrid 28	CMS ×Pollinator 28	7
F-20505	شاهد رقم IR ۷ (هیبرید تجاری)	18	Hybrid 36	CMS ×Pollinator 26	8
F-20654	شاهد رقم ماندراین (هیبرید تجاری)	19	Hybrid 42	CMS ×Pollinator 42	9
SBSI4	شاهد رقم پایا (هیبرید تجاری)	20	Hybrid 44	CMS ×Pollinator 44	10

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]

جدول ۲- توالی و دمای اتصال آغازگرهای SSR مورد استفاده (مقاله مروری، Ćurčić et al.(2017)

شماره	نام نشانگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	دمای اتصال بهینه	منبع
1	SB15	5′-CACCCAGCCTATCTCTCGAC-3′ 5′-GTGGTGGGCAGTTTTAGGAA-3′	58	Richards et al. 2004
2	FDSB502	5′-GCAAAAACCCAAAACCCTTT-3′ 5′-TTTCTCTCTCCTCCTCTTCCTC-3	52	Laurent et al. 2007
3	FDSB1011	5′-CAACTTATTTAAGCCTTTTAGTGC-3′ 5′-GATCCATTTATTTCGTGTTGA-3′	52	McGrath et al. 2007
4	SB04	5′-ACCGATCACCAATTCACCAT-3′ 5′-GTTTTGTTTTGGGCGAAATG-3′	52	Richards et al. 2004
5	SB06	5′-AAATTTTCGCCACCACTGTC-3′ 5′-ACCAAAGATCGAGCGAAGAA-3′	56	Richards et al. 2004
6	FDSB990	5′-TCTCACCTGAAATCCGAACC-3′ 5′-CCATCCGTAACTCGGTGACT-3′	58	Laurent et al. 2007
7	521.6	5′-AATAAAAAAATGTTAAAAAAGCAC-3′ 5′-AAAACAGAGGTAAATCGGTCAAAC-3′	52	McGrath et al. 2007
8	SB07	5′-TGTGGATGCGCTTTCTTTTC-3′ 5′-ACTCCACCCATCCACATCAT-3′	56	Richards et al. 2004
9	BQ583448	5′-TATTGTTCTAAGGCACGCA-3′ 5′-CGCTATCCTCTTCGTCAA-3′	53	McGrath et al. 2007
10	FDSB568	5′-TTCTGGGGATGATTTCTTCG-3′ 5′-CCGGGACAGAGAGAACAGAG-3′	56	Laurent et al. 2007

جدول ۳- توالی آغازگرهای RAPD (شرکت سیناژن)

شماره	نام پرایمر	توالی پرایمر
1	F	5'-CCC-ACT-GAT-G-3'
2	E	5'-ACT-TGT-GCG-G-3'
3	C	5'CCG-GCA-TAG-A-3'
4	J	5'-CCT-CAC-CTC-T-3'
5	D	5'-TGG-GCT-CGC-T-3'
6	I	5'-GCG-GGA-GAC-C-3'
7	B	5'CGG-AGA-GG-CG-A-3'
8	G	5'-CTG-AGG-AGT-G-3'
9	H	5'-GGT-CAA-CCC-T-3'

لازم به ذکر است که تعداد آغازگرهای RAPD مورد استفاده در آزمایش حدود ۳۰ آغازگر بود که به‌دلیل عدم تفکیک مطلوب و عدم تکثیر، تنها ۹ تا برای ادامه کار انتخاب شدند.

برای انجام واکنش PCR از مسترمیکس۲X شرکت آمپلیکون در حجم‌های ۲۰ میکرولیتری و از دستگاه ترموسایکلر (Analytikjena مدل Gradient) با برنامه دمایی مشخص جهت تکثیر قطعات استفاده شد.

برنامه واکنش PCR به شرح زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای بهینه هر یک از آغازگرها به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. (Abbasi and Majidi 2015) محصولات PCR به‌دلیل تفکیک‌پذیری بهتر آغازگرها بر روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی، نوارهای DNA با دستگاه ژل داک مشاهده و تصویربرداری شدند. انجام واکنش PCR برای هر یک از آغازگرها سه مرتبه انجام شد تا تکرارپذیری ظهور باندها مورد تایید قرار بگیرد. برای امتیاز دادن باندها با استفاده از تصاویر اسکن شده و با کمک نرم‌افزار ژل آنالایزر، قطعات تکثیری نشانگرها مشخص شدند. بدین ترتیب که حضور باند با (۱) و عدم حضور با (۰) امتیاز داده شد و سپس تجزیه‌ی خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و روش UPGMA انجام شد و دندروگرام مربوطه رسم شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که استخراج DNA به روش CTAB برای نمونه‌های برگی چغندرقند به‌خوبی انجام گرفت. غلظت DNA در بهترین شرایط تا هزار نانو گرم در میکرولیتر بود. همچنین نسبت جذب در طوج موج ۲۶۰ به ۲۸۰ به‌طور متوسط بین ۱/۵ تا ۲ بود. بررسی کیفیت نمونه‌های DNAی استخراج شده با استفاده از ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که DNAهای استخراجی از کیفیت مطلوبی برخوردارند. از ۱۰ آغازگرSSR استفاده شده، ۹ آغازگر چندشکلی بالایی را نشان دادند و در ادامه از آن‌ها برای آنالیز استفاده شد (شکل۱). محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از جمله ملاک‌هایی می‌باشد که تحت تاثیر تعداد آلل در جایگاه مورد نظر و فراوانی اللی برای هر آغازگر قرار می‌گیرد. از ۱۰ آغازگر SSR آزمون شده، ۹ آغازگر در مکان‌های تکثیر شده چند شکلی نشان دادند و دو آغازگر BQ583448 و FDSB502 بیشترین PIC را دارا بودند. بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی در بین آغازگرهای SSR و RAPD به‌ترتیب آغازگر BQ583448 با ۷۶٪ و آغازگر J با ٤٤٪ را دارا بودند (جدول ٤ و ٥). به‌طور کلی بالا بودن میزان PIC آغازگرها بیانگر کارایی بالای این آغازگرها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشد (Ren and timko 2001).

تجزیه خوشه‌ای: تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها یا افراد کاربرد دارد. در این نوع تجزیه، فواصل ژنتیکی به‌منظور مشخص نمودن دوری و نزدیکی افراد از نظر ژنتیکی، محاسبه می‌شوند و سپس نمودار درختی (Dendrogram) ترسیم می‌شود. به‌منظور گروه‌بندی ارقام براساس داده‌های SSR و RAPD از نرم‌افزار NTSYS استفاده شد

.

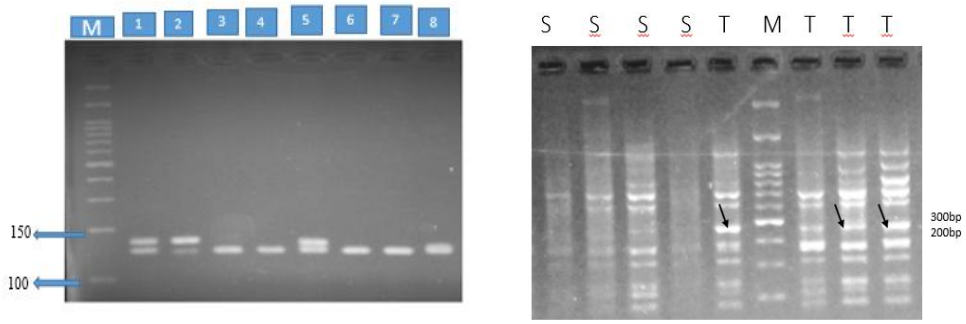
جدول ٤- مشخصات و اطلاعات مرتبط با آغازگرهای SSR

شماره	نام آغازگر	تعداد باندهای مشاهده شده	درصد باندهای چند شکل	دامنه اندازه باندها(bp)	PIC
1	SB15	3	66	100-200	0.52
2	FDSB502	4	50	200-600	0.69
3	FDSB1011	2	100	100-200	0.42
4	SB04	3	100	100-200	0.68
5	SB06	3	100	200-300	0.64
6	FDSB568	3	100	200-300	0.65
7	FDSB990	1	-	100	-
8	521.6	4	100	100-600	0.63
9	SB07	2	100	100-200	0.18
10	BQ583448	5	80	200-700	0.76

جدول٥- مشخصات و اطلاعات مرتبط با آغازگرهایRAPD

شماره	نام آغازگر	تعداد باندهای مشاهده شده	درصد باندهای چند شکل	دامنه اندازه باندها (bp)	PIC
1	F	5	80	400-1000	0.32
2	E	6	80	200-900	0.32
3	G	3	80	100-200	0.32
4	H	5	75	200-600	0.37
5	I	5	80	100-800	0.32
6	J	6	66	100-500	0.44
7	C	3	80	100-500	0.32
8	D	3	80	300-500	0.32
9	B	4	80	200-600	0.32
10	A	4	75	300-800	0.37

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]



الف ب

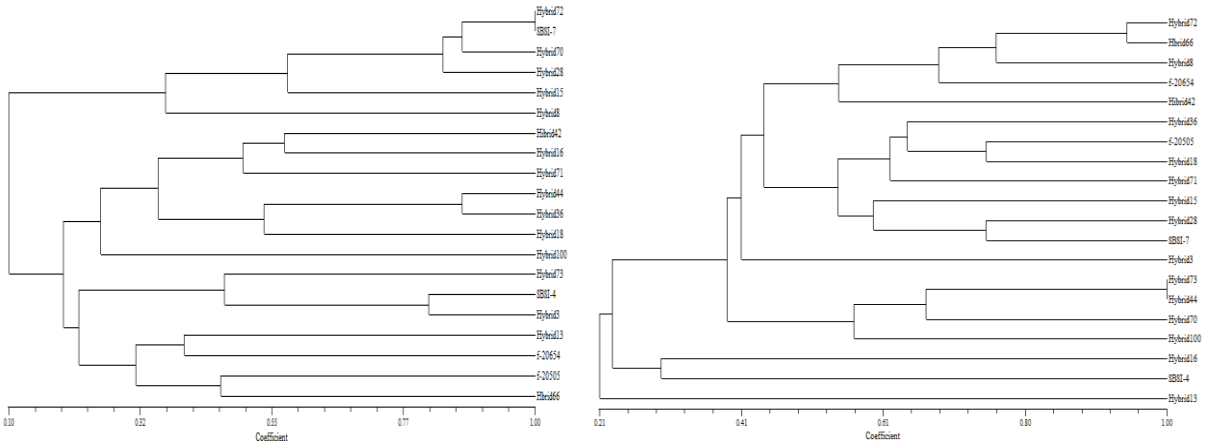
شکل۱- الف) الگوی نواربندی آغازگر FDSB502 بر روی ۸ نمونه چغندرقند، بر روی ژل آگارز دو درصد، ترتیب نمونه‌ها از چپ به راست (Hybrid100، Hybrid66، Hybrid 8، Hybrid3، Hybrid18، Hybrid42، Hybrid44، Hybrid28)، همراه با M (۴/۵ ماکرولیتر از نشانگر 100 bp plus)، ب) تفکیک ارقام متحمل و حساس توسط پرایمر J (S: نشانگر هیبریدحساس به خشکی، T: نشانگر هیبرید تحمل به خشکی، M: نشانگر اندازه)، نام و ترتیب هیبریدها از چپ به راست (SBSI-4، Hybrid73، Hybrid16، Hybrid3، Hbrid15، Hybrid66، F-20654، Hybrid70).

در هر دو دندروگرام، تعیین خط برش با استفاده از روش مبنا (به‌صورت دستی)، و سطح شباهت تقریبا ۳۰ درصدی انجام شد به گونه‌ای که نمونه‌ها براساس میزان شاخص STI مشابه (متحمل، نیمه حساس و حساس) در یک گروه قرار گیرند. حاصل از دندروگرام نشانگر SSR بدین شرح است: هیبریدهای Hybrid 72، Hybrid 66، Hybrid 8، F-20654، Hybrid42 ، Hybrid36 ، F-20505، Hybrid 18، Hybrid 71، Hybrid 15، Hybrid 28 ، SBSI-7، Hybrid3،Hybrid73، Hybrid44، Hybrid70، Hybrid100 در یک گروه قرار گرفتند، در گروه دوم هیبرید تجاری SBSI-4 و Hybrid16 و در گروه سوم هیبرید Hybrid 13 قرار گرفتند. نتایج حاصل از دندروگرام نشانگر RAPD بدین شرح است: هیبریدهای Hybrid72، SBSI-7، Hybrid70، Hybrid28، Hybrid15، Hybrid8 در گروه اول و هیبریدهای Hybrid42، Hybrid16، Hybrid71، Hybrid44، Hybrid36، Hybrid18، Hybrid100 درگروه دوم قرار گرفتند. در گروه سوم هیبریدهای Hybrid73، SBSI-4، Hybrid3 و در گروه چهارم هیبریدهای Hybrid13، F-20654، F-20505 و Hybrid66 قرار گرفتند. (شکل۲)

تجزیه به مختصات اصلی: یکی از روش‌های چند متغیره، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌باشد که کاربرد زیادی دارد. تجمع اعضاء در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان روشی برای کاستن حجم داده‌ها به‌منظور روشن ساختن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه تغییرات کل داده‌های اصلی و اولیه به‌وسیله تعداد محدودی از متغیرهای جدید مستقل به نام مختصات اصلی است. با استفاده از این نوع دسته‌بندی تفاوت بین اعضاء نشان داده می‌شود و امکان مشاهده همه گروه‌ها را میسر می‌کند. کاهش حجم داده‌ها به‌وسیله تبدیل خطی داده‌های اصلی به متغیرهای مستقل جدیدی که به‌عنوان مختصات اصلی شناخته می‌شوند صورت می‌گیرد. به‌طوری که اولین مؤلفه بیشترین مقدار تغییرات داده‌های اولیه را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم بیشترین مقدار تغییرات باقی‌مانده را بعد از مؤلفه اول توجیه می‌کند و الی آخر. لازم به ذکر است که هر مؤلفه تغییراتی را توجیه می‌کند که توسط مؤلفه‌های قبلی بیان نشده باشد (Mohammadi and Prasanna 2003).

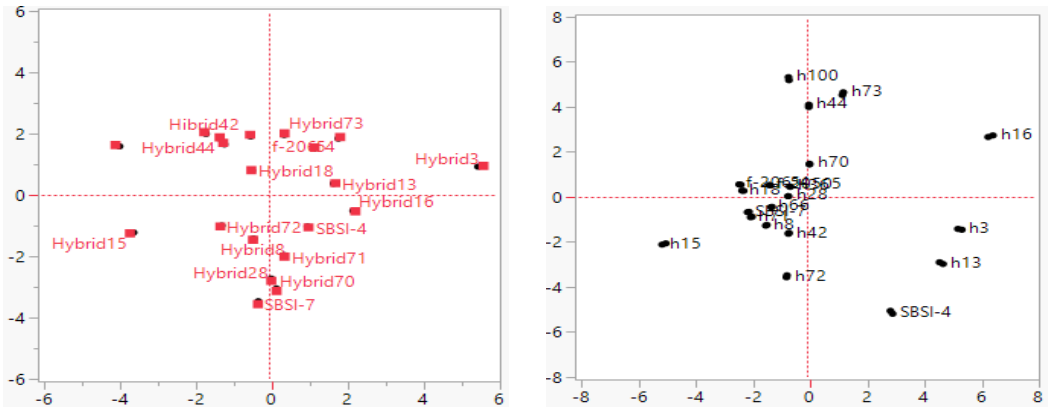
براساس تجزیه به مؤلفه اصلی برای آغازگرSSR، مؤلفه اول (PC1) ۲۰ درصد، مؤلفه دوم (PC2) ۱۶/۵ درصد و مؤلفه سوم (PC3) ۱۵/۲۵ درصد و همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای آغازگر RAPD مؤلفه اول (PC1) ۱۴/۲۵درصد، مؤلفه دوم (PC2) ۱۲/۷ درصد و مؤلفه سوم ۸/۹۲ درصد از کل تنوع را توجیه می‌نمود (شکل۳)، که نشان‌دهنده نمونه‌برداری نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]



شکل A شکل B

شکل۲- A وB به‌ترتیب دندروگرام نشانگر SSR و RAPD به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد



شکل B شکل A

شکل ۳- A و B به‌ترتیب پلات تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای ۱۰ نشانگرRAPD، پلات تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای ۱۰ نشانگر SSR

لذا با توجه به این‌که هریک از نشانگرهای مورد استفاده از بخش‌های متفاوت ژنوم هستند، بنابراین دارای همبستگی کمتری می‌باشند.

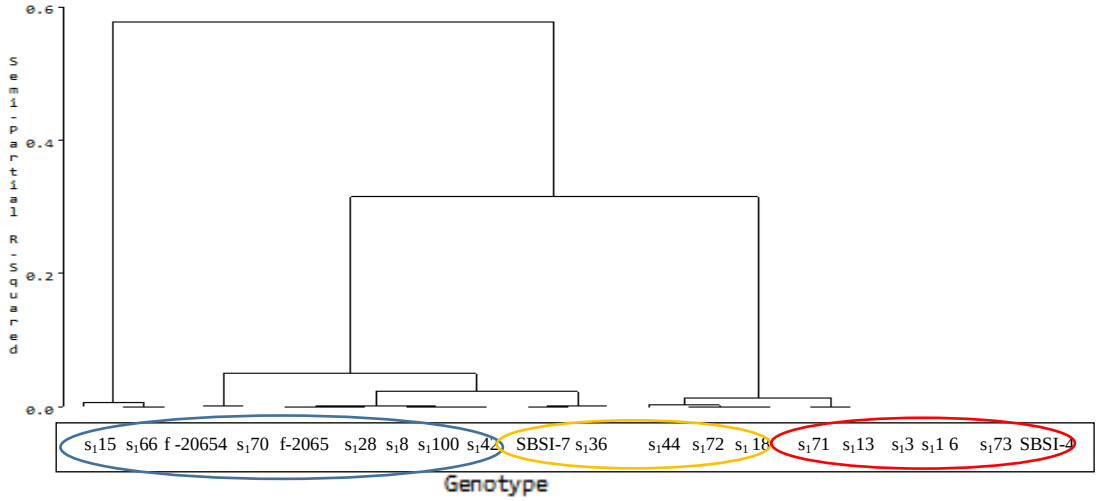
بررسی ارتباط بین آغازگرهای SSR و RAPD با تنش خشکی: بررسی‌های مزرعه‌ای Ahmadi et al. (2018) نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر شاخص STI در سه گروه عمده متحمل، نیمه حساس و حساس به خشکی قرار گرفتند (جدول ٦) که گروه اول شامل ۹ هیبرید (Hybrid 15، Hybrid 66، هیبرید تجاری F-20654، Hybrid 70، هیبرید تجاری F-20505، Hybrid 28، Hybrid 8، Hybrid 100، Hybrid 42)، گروه دوم شامل ۵ هیبرید (هیبرید تجاری SBSI-7، Hybrid 36، Hybrid 44، Hybrid 72، Hybrid 18) و گروه سوم شامل ٦ هیبرید (Hybrid 71، Hybrid 13، Hybrid 3، Hybrid 16، Hybrid 73، هیبرید تجاری SBSI- 4) بودند (شکل ٤).

نتایج حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای بر اساس بیشترین و کمترین عملکرد ریشه با توجه به شاخص STI نشان داد که هیبرید Hybrid15 متحمل‌ترین و هیبرید SBSI-4 حساس‌ترین هیبرید می‌باشند، لذا در کل از هیبریدهای گروه اول برای ادامه برنامه‌های اصلاحی تحمل به خشکی می‌توان بهره برد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]

جدول ٦- ترتیب نمونه‌های استفاده شده در تجزیه خوشه‌ای براساس شاخص STI (2018) Ahmadi et al.

شماره	نام هیبرید	STI	شماره	نام هیبرید	STI
1	Hybrid 15	0.83	11	Hybrid 36	0.59
2	Hybrid 66	0.78	12	Hybrid 44	0.56
3	F-20654	0.77	13	Hybrid 72	0.55
4	Hybrid 70	0.69	14	Hybrid 18	0.53
5	F-20505	0.66	15	Hybrid 71	0.50
6	Hybrid 28	0.62	16	Hybrid 13	0.47
7	Hybrid 8	0.61	17	Hybrid 3	0.46
8	Hybrid 100	0.61	18	Hybrid 16	0.46
9	Hybrid 42	0.60	19	Hybrid 73	0.43
10	SBSI7	0.59	20	SBSI4	0.41



شکل ٤- تجزیه خوشه‌ای به‌منظور ارزیابی صفت تحمل به خشکی بر اساس شاخص STI با استفاده از روش Ward، گروه اول (شامل هیبریدهای متحمل به خشکی)، گروه دوم (شامل هیبریدهای نیمه حساس) و گروه سوم (شامل هیبریدهای حساس به خشکی، شاخص STI کم) (2018) Ahmadi et al.

لازم به ذکر است بررسی نتایج حاصل از آغازگرهای SSR در تفکیک ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی برروی ژل آگارز با استفاده از لدر 100bp شرکت دنازیست (با توجه به اینکه کمترین باند لدر bp۱۰۰ می‌باشد با استفاده از نرم‌افزار ژل آنالایزر باندها امتیازدهی شدند)، نشان داده شد که در مجموع ۷۰ باند برای تجزیه و تحلیل ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی شناسایی شدند که از این تعداد ۱۵ مورد باند متحمل به خشکی، ۷ مورد حساس به خشکی و ٤٨ مورد باقی‌مانده مابین این دو بودند درمجموع دو آغازگر BQ583448 و FDSB502 به‌طور قابل توجهی باعث تمایز هیبریدهای حساس و متحمل به خشکی در هیبریدهای چغندرقند مورد آزمایش شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از نشانگر مولکولی SSR برای شناسایی ارقام متحمل یا حساس به خشکی چغندرقند تا حدی مفید خواهد بود. در تحقیقی بر روی تجزیه و تحلیل بهبود تحمل به خشکی دانه در۲٤ لاین ذرت با استفاده از ۱۰۰ نشانگر مولکولی SSR، در مجموع ٤٦٥ باند برای تجزیه و تحلیل ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی شناسایی شدند که از این تعداد ۱۹۹ مورد باند متحمل به خشکی، ۳۵ مورد حساس به خشکی و ۲۳۱ مورد باقی‌مانده مابین این دو بودند. همچنین ۸۸ نشانگر SSR مقاوم به خشکی شناسایی شدند. در نتیجه مشخص شد که نشانگر SSR می‌تواند کمک زیادی درشناسایی نشانگرهای متحمل به خشکی در ذرت شود (Ullah et al. 2018). در پژوهشی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام متحمل به خشکی در ۲۰ لاین گندم در مقایسه با شاهد با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR، تنوع قابل توجهی در تحمل به خشکی مشاهده شد (Khaled et al. 2015). در بررسی (Alzohairy 2010) بروی ۱۰رقم برنج برای یافتن ارقام متحمل به خشکی با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR، از ١٦ آغازگر RAPD، ٥ آغازگر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]

پلی‌مورفیسم نشان دادند که در این بین آغازگرهای RAPD :OPA-05 و OPA-11 بیشترین درصد پلی‌مورفیسم را نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر، پژوهشگران با استفاده از نشانگرهای SSR به‌عنوان ابزاری برای غربالگری ژنوتیپ‌های ذرت برای تحمل به خشکی برروی شش والد و سی نتاج در نسل اول استفاده کردند که در نتیجه مشخص شد ۷ آغازگر به‌طور قابل توجهی باعث تمایز ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی و حساس به خشکی در ذرت می‌شوند (Bawa et al. 2015). لازم به ذکر است که آزمون مانتل با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد و همبستگی زیادی بین کلاسترهای مولکولی با کلاستر حاصل از شاخص STI حاصل نشد که می‌توان از جمله دلایل آن به مواردی چون تأثیرگذاری محیط بر صفات مورفولوژیکی نمونه و تصادفی بودن نشانگرهای مولکولی مورد تحقیق در سطح ژنوم اشاره نمود که ممکن است لینکاژ مناسبی بین ژن‌های کنترل‌کننده صفات مورد بررسی و نشانگرهای مورد استفاده برای تخمین فاصله ژنتیکی به‌دست نیاید.

منابع

Alzohairy AM (2010) Molecular markers for new promising drought tolerant lines of rice under drought stress via RAPD-PCR and ISSR markers. Journal of American Science 6:355-363.

Ahmadi M, Heravan EM, Sadeghian S, Mesbah M, Darvish F (2011) Drought tolerance variability in S1 pollinator lines developed from a sugar beet open population. Euphytica 178:339-349.

Ahmadi M, Abdulahian Noghabi M, Soltani J, Mahzouni J, Yousefabadi W, Hamidi H, Anahid S (2018) Evaluation of drought tolerant monogerm hybrids of sugar beet. Final research project report, Department of agricultural researches , education and promotion. Series 55452.p:32.

Abbasi Z, Majidi MM, Arzani A, Rajabi A, Mashayekhi P, Bocianowski J (2015) Association of SSR markers and morpho-physiological traits associated with salinity tolerance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Euphytica. 205:785-797.

Bawa A, Isaac AK, Abdulai MS (2015) SSR markers as tools for screening genotypes of maize (*Zea mays* L.) for tolerance to drought and Striga hermonthica (Del.) Benth in the Northern Guinea Savanna Zone of Ghana. Research in Plant Biology 5:17-30.

Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W, Courchamp F (2012) Impacts of climate change on the future of biodiversity. Ecology Letters. 15:365-377.

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.

Cooke DA, Scott J (1997) The sugar beet crop. Springer Science and Business Media.

Ćurčić Ž, Taški-Ajduković K, Nagl N (2017) Relationship between hybrid performance and genetic variation in self-fertile and self-sterile sugar beet pollinators as estimated by SSR markers. Euphytica. 213:108.

Degenkolbe T, Do PT, Kopka J, Zuther E, Hincha DK, Köhl KI (2013) Identification of drought tolerance markers in a diverse population of rice cultivars by expression and metabolite profiling. PLoS One. 8: e63637.

Deshmukh R, Tomar NS, Tripathi N, Tiwari S (2012) Identification of RAPD and ISSR markers for drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants. 18:101-104.

ElSayed AI, Rafudeen MS (2012) Molecular marker assisted for recognition drought tolerant in some of bread wheat genotypes. Journal of Crop Science and Biotechnology. 15:17-23.

Fernandez GCJ (1992) Effective selection critera for assessing plant stress tolerance.In: Kuo CG (Ed), Proceedings of the Intrnational Symposium on Adaptation of vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress, Publication, Tainan, Taiwan.

Joersbo M (2007) Sugar beet. Transgenic Crops IV. (pp: 355-379). Springer.

Keykhosravi H, Dehdari M, Masoumiasl A (2017) Evaluation Of Genetic Diversity In Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Genotypes Using ISSR Markers. Journal of Agricultural Biotechnology.

McGrath M, Trebbi D, Fenwick A, Panella L, Schulz B, Laurent V, Barnes SR, Murray SC (2007) An open-source first-generation molecular genetic map from a sugar beet × table beet cross and its extension to physical mapping. Crop Science 2007:47:27-44.

Mohammadi S and Prasanna B (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. Crop Science. 43:1235-1248.

Ren N, Timko MP (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species. Genome 44:559-571.

Khaled A, Motawea M, Said A (2015) Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 13:243-252.

Richards CM, Brownson M, Mitchell SE, Kresovich S, Panella LE (2004) Polymorphic microsatellite markers for

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]

inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Mol Ecol Notes 4:243-5. http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286. 2004.00630.x.
Srivastava S, Pathak A, Kumar R, Joshi B (2017) Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers. Journal of Environmental Biology. 38:777.
Laurent V, Devaux P, Thiel T, Viard F, Mielordt S, Touzet P, 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 115:793-805. http://dx.doi.org/10.1007/s00122-007- 0609-y.
Ullah FMQ, Jun MS, Kyong LJ (2018) Bulk Segregant Analysis (BSA) for the improvement of Drought Resistance in Maize (*Zea mays* L.) Inbred Lines as revealed by SSR Molecular Markers. Research Journal of Biotechnology Vol. 13. p: 2.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-09]