



"مقاله پژوهشی"

ارزیابی صفات و تنوع ژنتیکی لاین‌های اُتایپ چغندر قند برای تحمل به بیماری ریزومانیبا با استفاده از نشانگر مولکولی SSR

فرشته خورسندی^۱، سید حسن مرعشی^۲، مسعود احمدی^۳ و فرج اله شهریار احمدی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، (نویسنده مسوول: s.khorsandi89@gmail.com)

۲- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی

۳- دانشیار بخش تحقیقات چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۴- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲

صفحه: ۸۵ تا ۹۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: چغندر قند یکی از محصولات مهم زراعی در دنیا است و بخش عمده‌ای از شکر مصرفی در کشور ما از این گیاه تأمین می‌شود. برنامه‌های اصلاح نباتات براساس ایجاد تنوع و انتخاب صفات کمی و کیفی بررسی تنوع ژنتیکی اولین گام برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی از ۳۰ ژنوتیپ (لاین اوتایپ) که دارای صفات فنوتیپی متفاوت بودند استفاده شد. این آزمایش به صورت طرح آزمایشی بلوک کامل تصادفی در سطح مزرعه‌ای به اجرا درآمد. این ۳۰ ژنوتیپ از نظر صفات مورفولوژیکی «نمره رشد، رنگ برگ، یکنواختی ریشه، بیماری ریزومانیبا ریشه، درصد قند، عملکرد (وزن)، عملکرد قند» مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس آماری صفات مورد مطالعه نشان داد ژنوتیپ‌ها از نظر همه صفات اندازه‌گیری شده دارای اختلاف و تنوع معنی‌داری می‌باشند. همچنین ژنوتیپ‌ها به وسیله ۱۰ جفت آغازگر SSR مورد بررسی قرار گرفتند که از ۱۰ آغازگر SSR، ۳ آغازگر چند شکلی را نشان دادند. این ۳ آغازگر از نظر الگوی باندی مورد بررسی قرار گرفتند و باندها براساس وجود یا عدم وجود (صفر و یک) نمرده دهی شدند و برای درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها از ماتریس تشابه استفاده شد. که نتایج نشان داد از بین ۳ آغازگر مورد مطالعه، آغازگر SB06، ۱۰۰٪ چند شکلی را نشان داده که می‌توان نتیجه گرفت این نشانگر تنوع را بهتر نشان می‌دهد. علاوه بر ارزیابی صفات و تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی SSR، به‌منظور تعیین ارتباط بین صفات مورفولوژیکی و داده‌های مولکولی و شناسایی نشانگرهایی که پیوستگی با این صفات را دارند نیز از روش رگرسیون گام‌به‌گام انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رگرسیون گام‌به‌گام نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از مکان‌های ژنی آغازگرهای مورد مطالعه وجود دارند. مکان ژنی آغازگر SB06-1 با بیشترین تعداد صفت مرتبط بود. بالاترین همبستگی بین مکان ژنی آغازگر SB06-3، SB06-1 و صفت یکنواختی ریشه ($r=0.40^{**}$) در سطح ۱٪ را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با نتایج بدست آمده از تجزیه ارتباط می‌توان نتیجه گرفت که مکان ژنی آغازگر SB06-1 برای آغازگر SSR بالاترین ارتباط با صفات را نشان دادند. بنابراین، این نشانگرها می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط در مطالعه برنامه‌های اصلاحی چغندر قند مورد استفاده قرار بگیرند و از آن‌ها در انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SSR می‌توانند ژنوتیپ‌های چغندر قند را از هم تفکیک کرده و تنوع ژنتیکی را به خوبی نشان دهند. بنابراین از این نشانگرها می‌توان در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، چغندر قند، صفات مورفولوژیکی، نشانگر SSR

مقدمه

قند یکی از عمده‌ترین و ارزان‌ترین مواد غذایی است و به عنوان سرچشمه انرژی محسوب می‌شود (۸). چغندر قند یکی از محصولات مهم زراعی در دنیا است بخش عمده‌ای از شکر مصرفی در کشور ما از این گیاه تأمین می‌شود (۹). چغندر قند (*Beta vulgaris*) یک محصول مهم اقتصادی در مناطق با آب و هوای معتدل است و تقریباً ۲۵٪ تولید جهانی شکر را تشکیل می‌دهد. علاوه بر تولید شکر، صنعت قند سالانه مقدار زیادی از محصولات جانبی مانند ملاس و پالپ چغندر قند تولید می‌کند که به‌طور گسترده‌ای به عنوان مکمل‌های خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرند. (۱۴)

چغندر قند با نام علمی (*Beta vulgaris* L.) گیاهی دگرگشن، دیپلوئید و دو ساله از تیره اسفنج است که برای تولید ریشه ذخیره‌ای کشت می‌شود. چغندر قند یکی از دوازده گیاه اصلی است که غذای مردم جهان را تأمین می‌کند و از نظر ارزش غذایی در ردیف برنج، ذرت، گندم، سیب‌زمینی و حبوبات قرار می‌گیرد (۸). یکی از اهداف مهم در اصلاح گیاهان تولید گیاهی با عملکرد بالا می‌باشد. از جمله روش‌های دسترسی به چنین هدفی استفاده از هتروزیس

می‌باشد که در نتایج تلاقی دو والد مناسب دیده می‌شود. نر عقیمی از روش‌هایی است که می‌تواند این مشکلات را برطرف کند که در اصلاح نباتات در گیاهان مختلف از جمله چغندر قند برای بهبود و تولید واریته‌های با عملکرد بالا استفاده شده می‌شود. برای تهیه نتایج نر عقیمی از گیاهان نر عقیم، باید گیاهان CMS (cytoplasmic male sterility) نر عقیمی سیتوپلاسمی توسط گیاهان نگه‌دارنده نر عقیمی گرده‌افشانی شوند (در شاخه اصلاح چغندر قند به آن‌ها اوتایپ (O-TYPE) می‌گویند). این گیاهان ژن‌های کروموزومی نر عقیم را حمل می‌کنند اما دارای سیتوپلاسم نر مال می‌باشند. این گیاهان فقط از طریق آزمون تلاقی (تست کراس) تیپ‌های O مشابه با گیاهان نر عقیم قابل تشخیص هستند. اگر تمام نتایج چنین تلاقی نر عقیم باشند گیاه گرده‌افشانی که در عمل تلاقی به کار گرفته شد دارای ژنوتیپ تیپ O است. بر اثر خودکشتی مداوم یک تیپ O معین و تلاقی برگشتی آن با یک رگه نر عقیم، رگه‌های خالص اوتایپ و نر عقیم معادل آن‌ها به دست می‌آید. لاین اوتایپ مطلوب برای تهیه رقم باید دارای خلوص ژنتیکی بالا و یکنواختی زیاد، مقاومت به بیماری‌ها، دارای فرم مناسب

کامل انجام شود کاورها به مدت ۴۰-۳۰ روز باقی می‌ماند و زمانی که گرده‌افشانی کامل انجام شد روپوش‌ها برداشته می‌شوند تا بذرها به رشد فیزیولوژی برسند. در سال دوم از لاین S1 تک‌ریشه‌ها به‌عنوان لاین پدری یا گرده‌افشان استفاده شدند. سال سوم، لاین‌های گرده‌افشان پدری در کرت‌های ایزوله با یک لاین مادری نرعیقیم سیتوپلاسمی Cytoplasmic male sterile تلاقی داده شدند و بذر هیبرید تهیه شد.

در این آزمایش برخی از صفات مورفولوژیکی چغندر قند شامل عملکرد ریشه، عملکرد قند، درصد قند ریشه، نمره رشد، نمره رنگ برگ، یکنواختی ریشه، بیماری ریزومانیای ریشه اندازه‌گیری شد. وضعیت رشدی چغندر قند در هر کرت از نمره ۱ تا ۵ امتیاز داده شد. به این صورت که کرت‌های که رشد گیاه مطلوب بوده نمره ۵ و کرت‌هایی که رشد چغندر قند کم و نامطلوب بوده نمره ۱ اختصاص یافت. رنگ برگ چغندر قند در هر کرت براساس مقیاس ۵-۱ امتیازدهی شدند به این صورت که کرت‌هایی که رنگ برگ آن‌ها سبز پررنگ بوده نمره ۵ و کرت‌هایی که رنگ برگ آن‌ها زرد و ظاهری رنگ‌پریده داشتند نمره ۱ نمره دهی شدند. یکنواختی ریشه چغندر قند در هر کرت براساس مقیاس ۵-۱ امتیازدهی شدند. به این صورت که کرت‌هایی که ریشه‌های آن‌ها یکنواخت و یک اندازه رشد کرده‌اند را نمره ۵ و کرت‌هایی که ریشه آن‌ها غیریکنواخت و به یک اندازه نیستند نمره ۱ داده شد. در یادداشت‌برداری میزان این بیماری در هر کرت براساس مقیاس ۹-۱ امتیازدهی شدند. به این صورت که کرت‌هایی که ریشه‌های آن‌ها سالم هستند نمره ۱ (بسیار مقاوم) و کرت‌هایی که ریشه‌های آن‌ها ضعیف و ریشه‌ریشی شدید داشتند نمره ۹ (بسیار حساس) اختصاص یافت. برای اندازه‌گیری مقدار قند از هر کرت یک ریشه چغندر قند مناسب را انتخاب کرده و مقداری از بافت میانی ریشه را جدا کرده و شیره یا عصاره آن را با فشار جدا کرده و عصاره را در درون دستگاه رفراکتومتر متر گذاشته و سپس مقدار قند یادداشت شد. ریشه‌های هر کرت جمع‌آوری شده پس از کیسه‌گیری، وزن آن یادداشت شد. از حاصل ضرب درصد قند و عملکرد ریشه عملکرد قند به دست آمد. پس از نمونه‌برداری و ثبت اطلاعات در برنامه Excel نسبت به تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 90.1 اقدام شد. با استفاده از ضرایب همبستگی بین صفات روابط آن‌ها با یکدیگر مقایسه شد. برای مقایسه میانگین صفات موردمطالعه از آزمون LSD در سطح ۵ درصد استفاده شد.

استخراج DNA مطابق با دستورالعمل پروتکل آزمایشگاهی مرکز بیوتکنولوژی کاربردی سیمیت به روش CTAB با کمی تغییرات انجام شد. در این مطالعه آغازگرها براساس معیارهایی همچون محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و جایگاه آن‌ها بر روی کروموزوم انتخاب شدند. در این مطالعه از ۱۰ آغازگر SSR برای بررسی تنوع استفاده شد. آغازگرهای SSR توسط شرکت دنایست آسیا سنتز شدند (جدول ۲).

ریشه و قابلیت ترکیب پذیری بالایی با لاین نرعیقیم سیتوپلاسمی برای تولید سینگل کراس مادری خوب باشد (۱۴). در برنامه‌های اصلاحی، اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی (Genetic diversity) GD ضروری است. تا بتواند والدین با ویژگی‌های مطلوب را انتخاب نماید (۶). مطالعات تنوع ژنتیکی به ویژه برای انتخاب والدین با قابلیت ترکیب پذیری بالا بسیار مهم است که هنگام تلاقی احتمال به دست آوردن ژنوتیپ‌های برتر افزایش می‌یابد (۱۴). 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 در صورت بهره‌برداری صحیح از آن‌ها، واریته‌های جدید و مطلوب‌تر گیاهی را می‌توان تولید کرد. از آنجاکه موفقیت هر به‌نژادگر به تعیین تنوع و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی بستگی دارد، لذا ضروری است که تنوع موجود در جامعه گیاهی با استفاده از نشانگرها موردمطالعه قرار گیرد. اغلب به دلیل تنوع کم و تأثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA به عنوان ابزارهای کارآمد برای تعیین سطح تنوع و تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها به کار می‌روند (۸).

این مطالعه به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های اوتایپ چغندر قند و ارزیابی ژنتیکی آن‌ها از طریق نشانگرهای SSR و ارزیابی صفات مورفولوژیکی و همچنین شناسایی مکان‌های ژنومی مرتبط با صفات مورفولوژیکی در چغندر قند با استفاده از نشانگر مولکولی SSR، باهدف نهایی انتخاب بهترین ژنوتیپ از لحاظ عملکرد قند و مقاومت بیماری ریزومانیبا به‌عنوان والدین برای برنامه‌های اصلاحی چغندر قند استفاده شود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۳۰ ژنوتیپ شامل ۴ شاهد و ۲۶ لاین اوتایپ چغندر قند کشور تهیه‌شده بود (جدول ۱). در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی در حال ارزیابی بود و دارای صفات فنوتیپی متفاوت بودند استفاده شد. این آزمایش در اردیبهشت ۹۷ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی (مرکز طرق) به صورت طرح آزمایشی بلوک کاملاً تصادفی در سطح مزرعه‌ای به اجرا در آمد. در طول رشد رسیدگی‌های لازم انجام شد و در ۲۰ آبان ماه سال ۱۳۹۷ برداشت شد.

برای تهیه این هیبریدها در سال اول انتخاب تک‌ریشه براساس عملکرد قند انجام شد. برای تولید لاین S1، ریشه‌های انتخاب‌شده در آخر اسفندماه به خزانه منتقل شدند. هر ریشه از طول به چهار قسمت مساوی تقسیم شد، هر قسمت به فاصله ۲۵ سانتی‌متر از یکدیگر کشت شدند، فاصله هر مجموعه چهار قسمت تک‌ریشه‌ها به فاصله یک متر از هم می‌باشد. قبل از باز شدن گل‌ها بر روی این مجموعه چهارتایی یک کاور پوشانده شد. تا زمانی که گرده‌افشانی

جدول ۱- نام و کد ژنوتیپ‌های مورد استفاده

ژنوتیپ	کد	ژنوتیپ	کد	ژنوتیپ	کد	ژنوتیپ	کد	ژنوتیپ	کد
شکوفآ	۶۰	۳۴۱۲۲	۴۲	۳۴۱۰۷	۲۷	۳۴۰۹۶	۱۵	۳۴۰۸۲	۱
لکسیا	۶۱	۳۴۱۲۵	۴۵	۳۴۱۱۲	۳۲	مودکس	۱۶	۳۴۰۸۳	۲
		۳۴۱۲۶	۴۶	۳۴۱۱۳	۳۳	۳۴۰۹۹	۱۹	۳۴۰۸۴	۳
		۳۴۱۳۵	۵۵	۳۴۱۱۴	۳۴	۳۴۱۰۰	۲۰	۳۴۰۸۵	۴
		۳۴۱۳۷	۵۷	۳۴۱۱۵	۳۵	۳۴۱۰۲	۲۳	۳۴۰۸۹	۸
		۳۴۱۳۸	۵۸	۳۴۱۱۹	۳۹	۳۴۱۰۴	۲۴	۳۴۰۹۲	۱۱
		آریا	۵۹	۳۴۱۲۰	۴۰	۳۴۱۰۵	۲۵	۳۴۰۹۴	۱۳

جدول ۲- توالی و دمای اتصال آغازگرهای SSR مورد استفاده (۱۴)

شماره	نام نشانگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	دمای اتصال بهینه	منبع
۱	SB15	5'-CACCCAGCCTATCTCTCGAC-3' 5'-GTGGTGGCGATTTTATGGAA-3'	۵۸	ریچارد و همکاران، ۲۰۰۴
۲	FDSB502	5'-GCAAAAAACCCAAACCCCTTT-3' 5'-TTTCTCTCTCTCTCTCTC-3'	۵۲	لارنت و همکاران، ۲۰۰۷
۳	FDSB1011	5'-CAACTTATTTAAGCCTTTTAGTGC-3' 5'-GATCCATTTATTTCGTGTGA-3'	۵۲	ام سی گریس و همکاران، ۲۰۰۷
۴	SB04	5'-ACCGATCACCAATTCACCAT-3' 5'-GTTTTGTGTTTGGCGAAATG-3'	۵۲	ریچارد و همکاران، ۲۰۰۴
۵	SB06	5'-AAATTTTCCGCCACCACTGTC-3' 5'-ACCAAAGATCGAGCGAAGAA-3'	۵۶	ریچارد و همکاران، ۲۰۰۴
۶	FDSB990	5'-TCTCACCTGAAATCCGAACC-3' 5'-CCATCCGTAACCTCGGTGACT-3'	۵۸	لارنت و همکاران، ۲۰۰۷
۷	521.6	5'-AATAAAAAAATGTTAAAAAGCAC-3' 5'-AAAACAGAGGTAATCGGTCAAAC-3'	۵۲	ام سی گریس و همکاران، ۲۰۰۷
۸	SB07	5'-TGTGGATCGCGCTTTCTTTTC-3' 5'-ACTCCACCCATCCACATCAT-3'	۵۶	ریچارد و همکاران، ۲۰۰۴
۹	BQ583448	5'-TATTGTTCTAAGGCACGCA-3' 5'-CGCTATCTCTCTCGTCAA-3'	۵۳	ام سی گریس و همکاران، ۲۰۰۷
۱۰	FDSB568	5'-TTCTGGGGATGATTTCTTCG-3' 5'-CCGGGACAGAGAGAACAGAG-3'	۵۶	لارنت و همکاران، ۲۰۰۷

آنالیز، قطعات تکثیری نشانگرها سایزبندی شدند. داده‌ها به صورت اعداد صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازبندی شده و وارد نرم‌افزار Excel گردید. سپس ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد و دندروگرام براساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه Jacard برای آنالیز نشانگرهای مولکولی و ضریب تشابه دایس برای آنالیز صفات مورفولوژیکی ترسیم شد.

نتایج و بحث (الف) نتایج مزرعه‌ای

نتایج جدول تجزیه واریانس ژنوتیپ‌های مورد بررسی چغندرقد برای صفات اندازه‌گیری شده در جدول شماره ۳ ارائه شده است. نتایج جدول تجزیه واریانس برای صفات نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ بر کلیه صفات در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. به عبارت دیگر همه صفات در بین کلیه ژنوتیپ‌ها اختلاف و تنوع معنی‌دار وجود دارد و همچنین مقایسه میانگین صفات نیز نشان داد (جدول ۴). در عملکرد ریشه، ژنوتیپ‌های ۶۰ و ۶۱ به ترتیب با وزن ۱۰۵/۴۳ و ۷۹/۹۵ تن در هکتار بالاترین عملکرد ریشه را نشان دادند. در حالی که دارابی و همکاران (۳) به منظور انتخاب هیبریدهای مقاوم و تعیین ارزش زراعی آن‌ها، ژنوتیپ ۱۷۳-۱۶-۱۶-SEA1 در مشهد: ۸۴/۲۱ تن و در شیراز: ۶۳/۹۳ تن در

هر واکنش PCR شامل ۱۵ میکرولیتر مخلوط واکنش بود. هر یک از مواد واکنش در میکروتیوب‌های ۰/۲ استریل شده توزیع شد و در آخر به مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه‌های DNA در میکروتیوب‌ها توزیع شدند. چرخه حرارتی دستگاه ترموسایکلر شامل ۱- واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳ دقیقه در یک چرخه انجام شد. ۲- واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه در ۴۵ ثانیه و اتصال آغازگر با دمای TM در ۱ دقیقه و بسط نشانگر توسط آنزیم در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۱ دقیقه مجموعاً در ۳۱ چرخه انجام شد. ۳- بسط نهایی نشانگر با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه و ۴- چرخه انجام شد. ۴- مرحله نگهداری در ترموسایکلر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۰ دقیقه و یک چرخه انجام شد. پس از پایان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ۴ میکرولیتر از محصول PCR درون چاهک‌های الکتروفورز بارگذاری شد در کنار نمونه‌های مورد بررسی به منظور تخمین طول محصول واکنش بسته به اندازه‌ی قطعه تکثیری، ۴/۵ میکرولیتر Ladder 50 bp plus استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ به مدت ۲ تا ۲/۵ ساعت در دستگاه الکتروفورز، صورت گرفت. پس از پایان الکتروفورز، قطعات تکثیرشده تحت تأثیر نور فرابنفش توسط دستگاه Gel Documentaion مشاهده شد و عکس ژل ثبت گردید. برای امتیازدهی باندها از تصاویر اسکن شده استفاده شد و با کمک نرم‌افزار ژل

یافت. سلطانی و همکاران (۱۳) به منظور تعیین ارزش زراعی ارقام چغندر قند خارجی مقاوم به نماتد مولد سیست شامل ۲۰ رقم مورد ارزیابی قرار دادند که در خراسان رضوی نتایج نشان داد ریشه‌های ارقام Drafter و رقم شاهد Toucan با نمره یکنواختی ریشه ۴/۵ خوب رشد کرده اند. ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری ریزومانیبا در این مطالعه شامل ۱۶ و ۶۱ با امتیاز به ترتیب ۱/۷۵ و ۱ می‌باشند. بذرافشان و همکاران (۲)، به تعداد ۳۶ فامیل نیمه خواهری تتراپلوئید مربوط به دو جمعیت تتراپلوئید مقاوم به ریزومانیبا به همراه شاهد مقاوم و شاهد حساس در مزرعه آلوده به ریزومانیبا مورد ارزیابی قرار دادند در این تحقیق شاخص بیماری در شاهد مقاوم F-20704 (۳) بود که با شاخص بیماری ژنوتیپ‌های ۱۲، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۵، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۴، ۳۵ و ۳۶ تفاوت معنی داری در سطح پنج درصد نشان نداد و در یک گروه آماری قرار گرفتند. با توجه به اینکه صفت عملکرد قند، صفت ریزومانیبایی ریشه، درصد قند جزء صفات مهم اقتصادی محسوب می‌شوند. ژنوتیپ ۶۰ بهترین ژنوتیپ از لحاظ عملکرد قند و ژنوتیپ ۶۱ بهترین ژنوتیپ از نظر صفت بیماری ریزومانیبا و ژنوتیپ ۱۶ بهترین ژنوتیپ از نظر صفت درصد قند را نشان دادند. می‌توان نتیجه گرفت که در مجموع ژنوتیپ ۶۱ بهترین ژنوتیپ محسوب می‌شود.

هکتار، بیشترین میانگین عملکرد ریشه را به خود اختصاص داد. بالاترین درصد قند در این تحقیق به ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۵ به ترتیب با درصد قند ۲۱ و ۲۰/۸۷ را به خود اختصاص داد. در نتایج حمیدی و همکاران (۵) نشان داد در شرایط تنش رطوبتی مزرعه بیشترین درصد قند ریشه با ۲۴/۲۳ درصد مربوط به لاین hf6s می‌باشد. در این مطالعه از نظر عملکرد قند برترین ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ ۶۰ و ۶۱ با عملکرد به ترتیب ۱۸/۵۳ و ۱۴/۶۰ تن در هکتار نشان دادند. رجیبی و همکاران (۱۲)، ۸۰ فامیل نیمه خواهری چغندر قند را در شرایط تنش و بدون تنش مورد ارزیابی قرار دادند در شرایط نرمال ژنوتیپ شماره ۱۲ با ۶/۵۸ تن در هکتار بالاترین عملکرد قند را به خود اختصاص داد. بالاترین نمره رشد در این تحقیق ژنوتیپ‌های ۶۰ و ۶۱ می‌باشند و نمره رنگ برگ به ژنوتیپ ۲۵ (با امتیاز ۵، رنگ سبز تیره) اختصاص یافت. رجیبی و همکاران (۱۲)، صفت نمره رشد نیز مورد بررسی قرار دادند که در صفت نمره رشد تنوع مناسبی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده کردند به طوری که ژنوتیپ‌های ۶۱ و ۸۳ با نمره رشد ۴ دارای بیشترین یکنواختی رشد بودند و همچنین بین ژنوتیپ‌ها، هیچ ژنوتیپی که بتواند بالاترین نمره رشد (نمره ۵) را دریافت نماید مشاهده نکردند. در این آزمایش صفت یکنواختی ریشه ژنوتیپ ۶۰ و ۶۱ با یکنواختی بالا و با امتیاز ۵ اختصاص

جدول ۳- تجزیه واریانس

Table 3. Analysis of variance

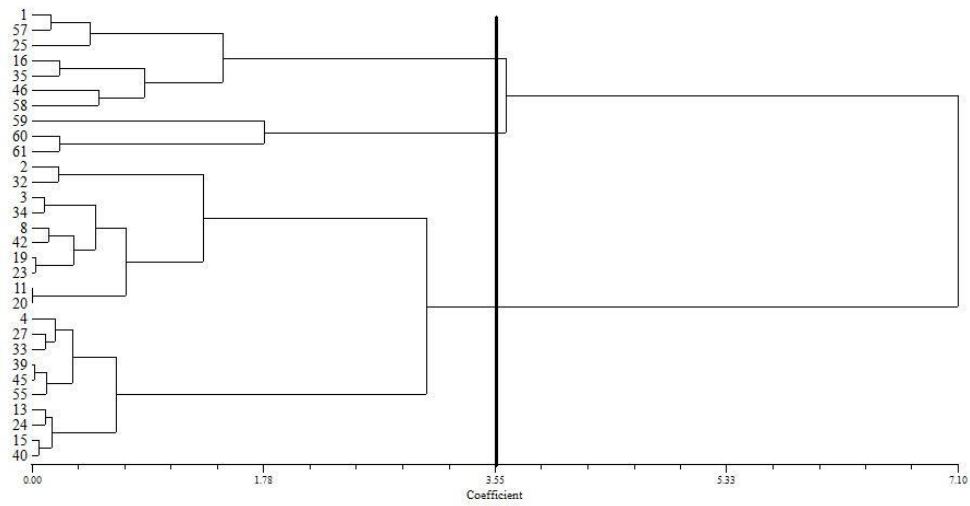
میانگین مربعات		رنگ برگ		نمره رشد		عملکرد قند		درصد قند		عملکرد ریشه		درجه آزادی		منابع تغییر	
ریزومانیبایی ریشه	۱/۴۸ ^{ns}	یکنواختی ریشه	۱/۱۳ ^{ns}	یکنواختی ریشه	۳/۱۷ ^{**}	رنگ برگ	۱/۵۱ [*]	نمره رشد	۰/۷۹ ^{ns}	عملکرد قند	۱۴/۰۲ ^{**}	درصد قند	۲۲۹/۴ [*]	عملکرد ریشه	۳
	۲/۳۹ ^{**}		۱/۹۹ ^{**}		۳/۰۴ ^{**}		۲/۰۱ ^{**}		۶۸/۲۶ ^{**}		۷/۸۵ ^{**}		۲۰۸۰/۱ ^{**}		تکرار
	۰/۸۹		۰/۴۶		۰/۳۷		۰/۵۵		۲/۵۵		۲/۳۷		۷۰/۲۵		ژنوتیپ
	۳۳/۰۳		۱۸/۵۵		۱۷/۰۹		۲۰/۸۱		۲۲/۸۴		۸/۴۴		۲۱/۹۱		خطا
															ضریب تغییرات

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد؛ ns: غیر معنی‌دار

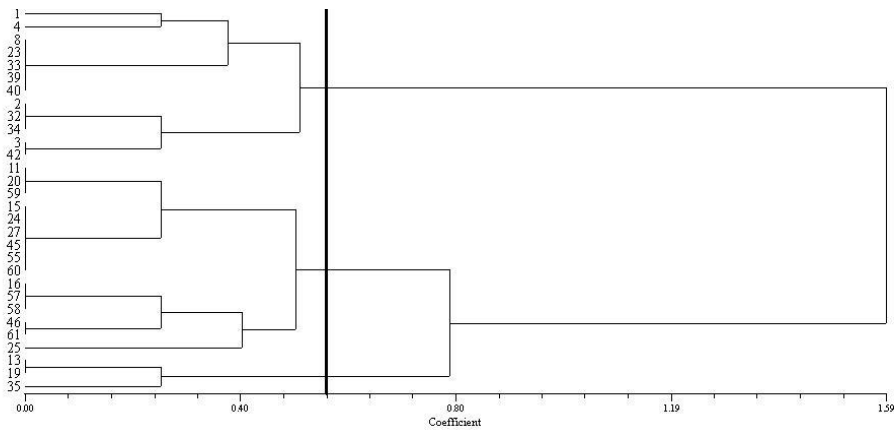
معنی‌داری بین عملکرد ریشه و نمره رشد ($r=0.82^{**}$) و رنگ برگ ($r=0.63^{**}$) و یکنواختی ریشه ($r=0.68^{**}$) وجود داشت. همبستگی منفی و معنی‌داری نیز بین عملکرد ریشه و ریزومانیبایی ریشه (-0.68^{**}) مشاهده شد. صفت درصد قند با کلیه صفات به استثنای رنگ برگ ($r=0.47^{**}$) همبستگی معنی‌داری نشان ندادند. بین صفت یکنواختی ریشه و نمره رشد ($r=0.64^{**}$)، یکنواختی ریشه و رنگ برگ ($r=0.48^{**}$)، عملکرد قند و نمره رشد ($r=0.83^{**}$)، عملکرد قند و رنگ برگ ($r=0.68^{**}$)، عملکرد قند و یکنواختی ریشه ($r=0.71^{**}$) همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده شد. صفت ریزومانیبایی ریشه با کلیه صفات به استثنای درصد قند همبستگی منفی و معنی‌داری نشان داد. بین ریزومانیبایی ریشه و رنگ برگ همبستگی منفی و در سطح ۵٪ معنی‌داری را نشان داد. بیماری ریزومانیبایی ریشه همبستگی منفی و معنی‌داری با کلیه صفات داشت، به عبارتی هر چه شدت بیماری بیشتر باشد درصد عملکرد ریشه و در نتیجه درصد عملکرد قند کاهش می‌یابد.

نتایج حاصل از دندروگرام نشان داد، عملکرد ریشه به سه گروه تقسیم شدند. ژنوتیپ‌ها در عملکرد قند به سه گروه تقسیم شدند گروه دوم دارای عملکرد قند بالاتری نسبت به گروه اول و سوم داشته که می‌توان این گروه را به عنوان ارقام برتر و در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار داد. صفت رنگ برگ به ۳ گروه تقسیم شدند گروه دوم برگ‌های آن‌ها سبز بوده و از نظر گروه، بهترین گروه را نسبت به دو گروه دیگر به خود اختصاص داد. صفت بیماری ریزومانیبایی ریشه به چهار گروه تقسیم شدند گروه اول بالاترین مقاومت را به بیماری ریزومانیبایی ریشه نشان دادند مقاوم بودن به این بیماری می‌تواند بر عملکرد و درصد قند تأثیر مثبتی بگذارد که می‌توان ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری ریزومانیبا را در برنامه اصلاحی بکار برد (اشکال ۱، ۲، ۳).

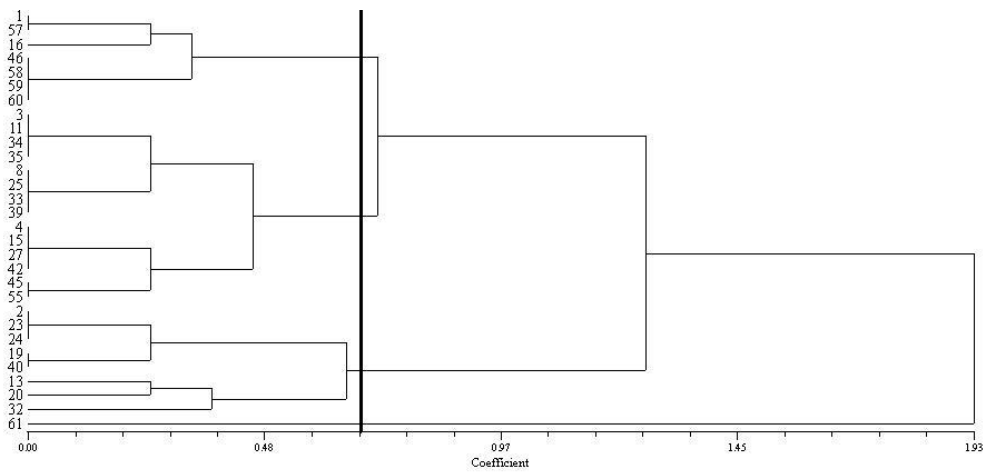
ضرایب همبستگی ساده تمامی صفات در ۳۰ ژنوتیپ مورد بررسی قرار گرفت و در جدول ۵ نشان داده شده است. بالاترین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین عملکرد قند و عملکرد ریشه ($r=0.98^{**}$) نشان داد. همبستگی مثبت و



شکل ۱- دندروگرام ژنوتیپ‌ها براساس عملکرد قند
Figure 1. Dendrograms of genotypes based on Sugar yield



شکل ۲- دندروگرام ژنوتیپ‌ها براساس صفت رنگ برگ
Figure 2. Dendrograms of genotypes based on leaf color trait



شکل ۳- دندروگرام ژنوتیپ‌ها براساس ریزومانای ریشه
Figure 3. Dendrograms of genotypes based on root rhizomania

ب) نتایج داده‌های مولکولی

در این مطالعه به منظور بررسی فاصله ژنتیکی از ۲۶ ژنوتیپ لاین اوتایپ و ۴ ژنوتیپ به عنوان شاهد به وسیله ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفتند که از ۱۰ جفت آغازگر استفاده شده، ۳ آغازگر چند شکلی را نشان دادند. از بین سه آغازگر مورد استفاده، آغازگر SB06، ۱۰۰٪ چند شکلی را نشان داد که می‌توان گفت این آغازگر تنوع را به خوبی نشان می‌دهد. (جدول ۶) الگوی بانندی نشانگرها در شکل (۴)، (۵)، (۶) آورده شده است. عسگری نژاد و همکاران (۱) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی، ۲۰ ژنوتیپ چغندر قند که مقاوم و حساس به نماتد سیستی بودند، با استفاده از نشانگر مولکولی

SSR مورد بررسی قرار دادند که 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. دندروگرام آغازگرهای FDSB502 و SB07 به ۵ گروه و آغازگر SB06 به ۷ گروه تقسیم‌بندی شدند (اشکال ۷، ۸، ۹).

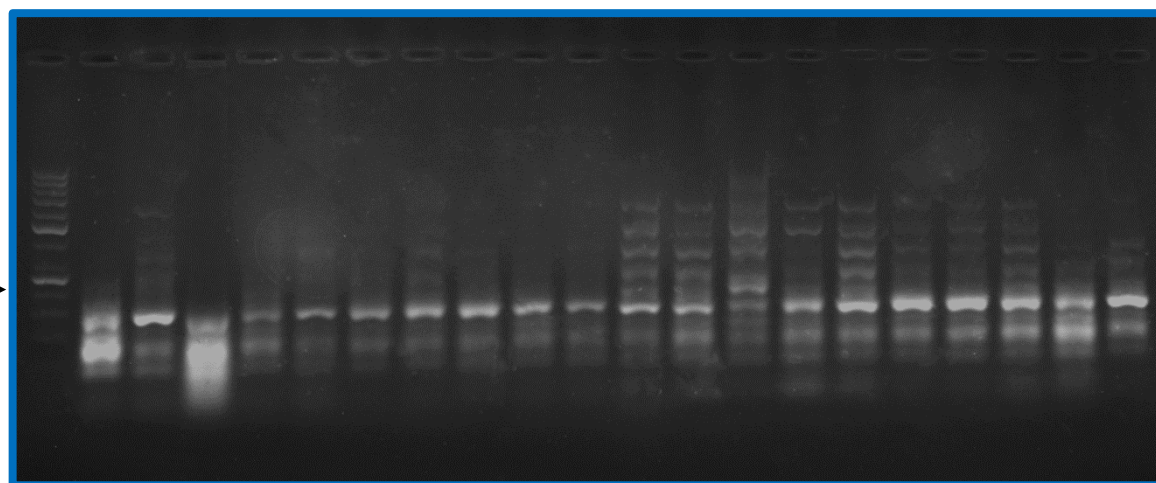
جدول ۶- محتوای اطلاعات چند شکلی نشانگرهای SSR

Table 6. Content of SSR markers polymorphic information

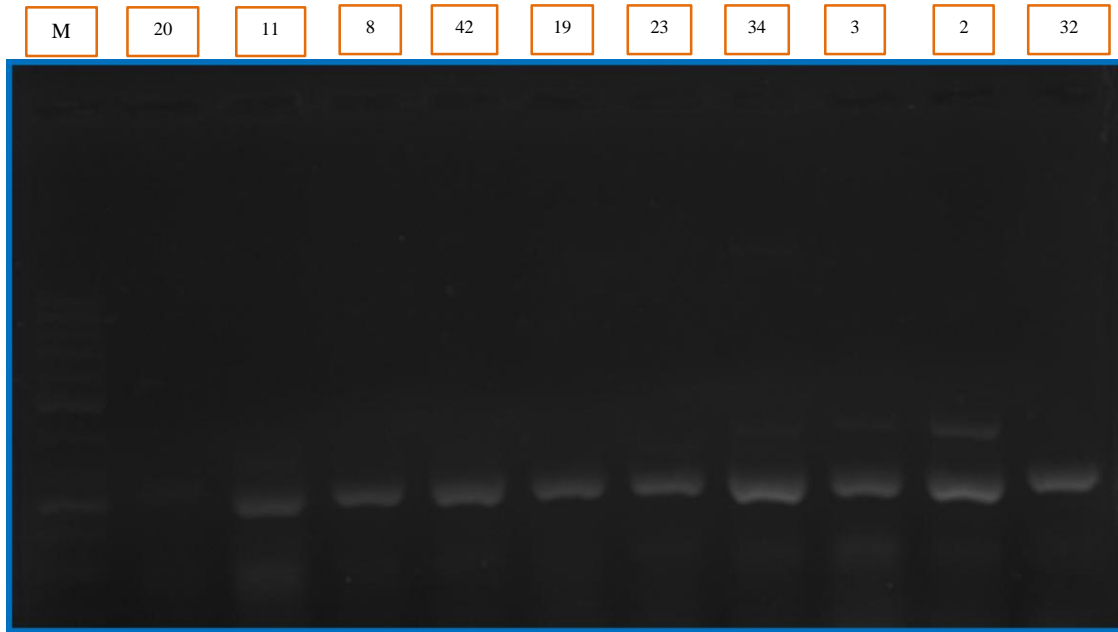
ردیف	نشانگر	تعداد مونومورف	تعداد پلی مورف	تعداد کل	دامنه اندازه (bp)	درصد چند شکلی
۱	SB502	۱	۷	۸	۶۰۰-۱۰۰	۰/۸۷
۲	SB06	۰	۱۱	۱۱	۸۰۰-۱۰۰	۰/۱۰۰
۳	SB07	۲	۶	۸	۶۰۰-۱۰۰	۰/۷۵



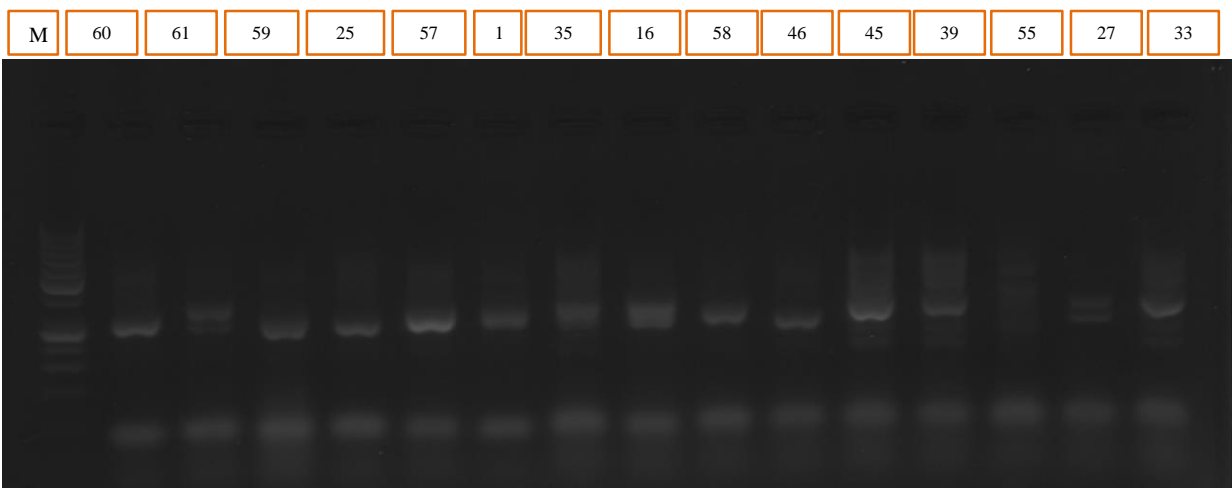
۳۰۰ bp →



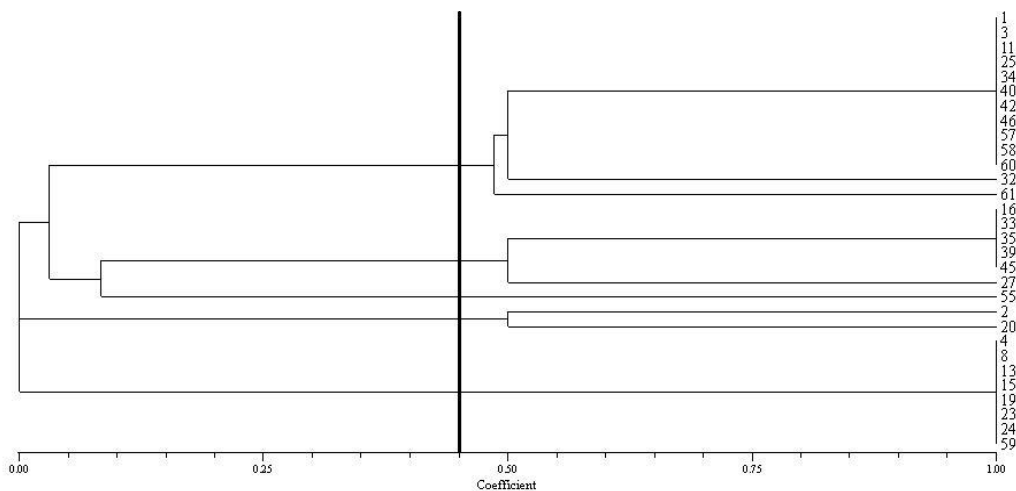
شکل ۴- الگوی نواری آغازگر SB06 در ۲۰ نمونه چغندر قند بر روی ژل آگارز دو درصد، همراه با M (۴/۵ ماکرولیتر از نشانگر 50 bp plus)
Figure 4. SB06 primer strip pattern in 20 sugar beet samples on 2% agarose gel, with M (4.5 macroliters from 50 bp plus marker)



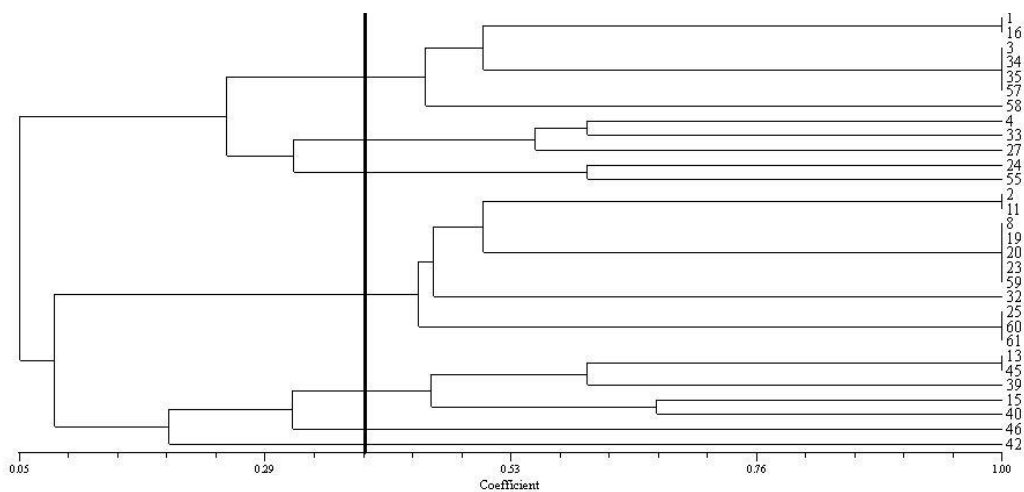
شکل ۵- الگوی نواری آغازگر SB07 در ۱۰ نمونه چغندر قند بر روی ژل آگارز دو درصد، همراه با M (۴/۵ ماکرولیتر از نشانگر 50 bp plus)
 Figure 5. SB07 primer strip pattern in 10 sugar beet samples on 2% agarose gel, with M (4.5 macroliters from 50 bp plus marker)



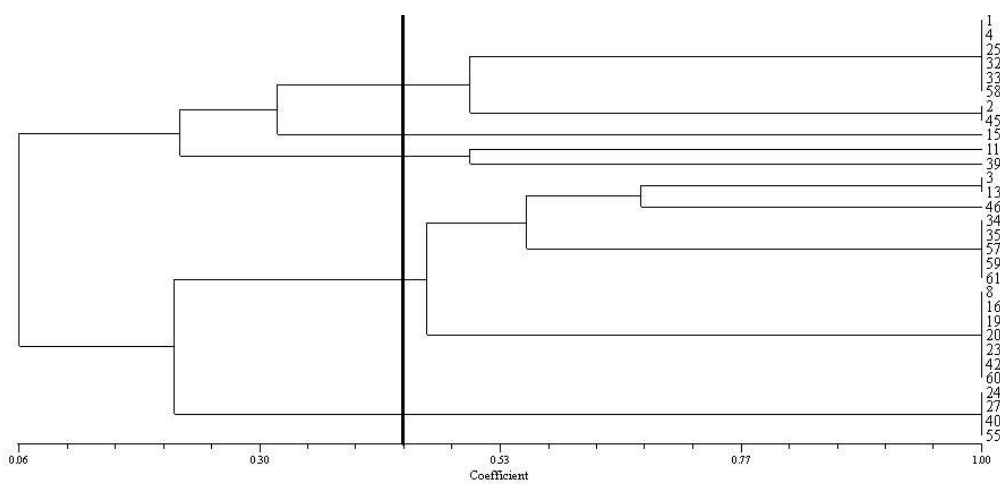
شکل ۶- الگوی نواری آغازگر FDSB502 در ۱۵ نمونه چغندر قند بر روی ژل آگارز دو درصد، همراه با M (۴/۵ ماکرولیتر از نشانگر 50 bp plus)
 Figure 6. FDSB502 primer strip pattern in 15 sugar beet samples on 2% agarose gel, with M (4.5 macroliters from 50 bp plus marker)



شکل ۷- دندروگرام آغازگر FDSB502، به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد
 Figure 7. FDSB502 primer dendrogram by UPGMA method using Jaccard similarity coefficient



شکل ۸- دندروگرام آغازگر SB06، به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد
 Figure 8. SB06 primer dendrogram by UPGMA method using Jaccard similarity coefficient



شکل ۹- دندروگرام آغازگر SB07، به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد
 Figure 9. SB07 primer dendrogram by UPGMA method using Jaccard similarity coefficient

تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام

به‌منظور تعیین ارتباط بین صفات مورفولوژیکی و داده‌های مولکولی و شناسایی نشانگرهایی که پیوستگی با این صفات را دارند از روش رگرسیون گام‌به‌گام استفاده شد (جدول ۶). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رگرسیون گام‌به‌گام نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از مکان‌های ژنی آغازگرهای مورد مطالعه وجود دارند. نتایج نشان داد که مکان ژنی آغازگر SB06-1 با بیشترین تعداد صفت مرتبط بود. این آغازگر ۳ مکان را در جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد. کمترین تعداد مکان ژنی برای صفات عملکرد ریشه، عملکرد

قند، نمره رشد یکسان بودند (SB06-1). در این نتایج آغازگر FDSB502 و SB07 با کلیه صفات همبستگی معنی‌داری نشان ندادند. درصد قند و صفت رنگ برگ در مکان ژنی آغازگر SB06 همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. در این مطالعه ریزومانیا ریشه با مکان ژنی SB06-3، SB06-1 در سطح ۵٪ معنی‌داری را نشان دادند. بالاترین همبستگی بین مکان ژنی آغازگر SB06-3، SB06-1 و صفت یکنواختی ریشه ($r=0.40^{**}$) در سطح ۱٪ را نشان دادند. کمترین همبستگی بین مکان ژنی آغازگر SB06-1 و صفت نمره رشد ($r=0.21^{**}$) در سطح ۱٪ نشان دادند.

جدول ۷- تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام برای صفات و نشانگرهای SSR

صفت	مکان ژنی (نشانگر)	R ² تصحیح‌شده
عملکرد ریشه	SB06-1	۰/۲۳**
عملکرد قند	SB06-1	۰/۳۰**
درصد قند	-	-
ریزومانیا ریشه	SB06-1, SB06-3	۰/۳۰*
نمره رشد	SB06-1	۰/۲۱**
رنگ برگ	-	-
یکنواختی ریشه	SB06-1, SB06-6	۰/۴۰**

** و * : به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

با نتایج بدست آمده از تجزیه ارتباط می‌توان نتیجه گرفت که قطعه SB06-1 برای آغازگر SSR بالاترین ارتباط با صفات را نشان دادند. بنابراین، این نشانگرها می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط در مطالعه برنامه‌های اصلاحی چغندر قند مورد استفاده قرار بگیرند و از آن‌ها در انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

پیشنهادات

- ۱- با توجه به اهمیت موضوع، می‌بایست از لاین‌هایی که در این تحقیق برتری نسبی خوبی از نظر صفات کمی و کیفی داشته‌اند، در یک چرخه دیگر اصلاحی استفاده نمود و از طریق انتخاب، صفات کیفی را در اوتایپ‌ها بدست آمده افزایش داد.
- ۲- لاین‌های خیلی مقاوم و مقاوم برای بیماری‌های مهم در کشور نظیر ریزومانیا ارزیابی شوند.
- ۳- از تلاقی لاین‌های اوتایپ خیلی مقاوم با لاین‌های نرعقیم مقاوم به ریزومانیا، سینگل کراس‌های مقاوم به ریزومانیا تهیه شود.
- ۴- از لاین‌های اوتایپ خیلی مقاوم ۱، ۵۷، ۴۶ و ۵۸ دوباره S1 تهیه شود.

رحیمی (۱۱)، به‌منظور تجزیه و تحلیل ارتباط بین نشانگرهای ISSR با برخی از صفات زراعی در ۲۲ توده اسفرزه به این نتیجه رسید که ۴۸ نشانگر ارتباط معنی‌داری با صفات نشان دادند. کریم و همکاران (۷)، در تجزیه رگرسیون داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیکی برنج به این نتیجه رسیدند که در مجموع ۷۰ نشانگر برای شرایط نرمال و ۷۲ نشانگر برای شرایط تنش خشکی برای صفات مورفولوژیکی نشان دادند. در شرایط تنش خشکی بیشترین توجیه تغییرات مربوط به صفت عملکرد در هکتار (۰/۱۷) توسط مکان‌های ژنی 1-3ISSR، 8-10ISSR، 6-10ISSR، 8-10ISSR، 1-3ISSR و 9-10ISSR تبیین شد. فرخی و همکاران (۴)، برای شناسایی نشانگرهای ریزوماهواره‌ای با صفات مورد مطالعه در ارقام سیب بومی ایران تجزیه ارتباط انجام شد نتایج نشان داد برای سه صفت زاویه شاخه، شاخص کلروفیل و مساحت مقطع عرضی تنه هیچ نشانگر پیوسته‌ای وجود ندارد. عزیزی و همکاران (۱۰)، به‌منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ۱۳ صفت مورفولوژیک در یونجه زراعی انجام دادند که در نتایج تجزیه ارتباط ۴۶ درصد مکان‌های شناسایی شده مبتنی بر نشانگرهای ISSR و ۶۱/۵ درصد نشانگرهای مورد مطالعه SSR با صفات مورد بررسی ارتباط معنی‌داری داشتند.

منابع

1. Asgarinejad, P. and J. Dost. 2016. Evaluation of genetic diversity of sugar beet genotypes resistant to the cystic nematode *Heterodera schachtii* using SSR molecular markers. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 3(29): 302-311.
2. Bazrafshan, M. and S. Darabi. 2015. Screening of tetraploid half-sister families for rhizomania resistance, morphological traits and quality. Sugar beet seed breeding research institute. Final Report 49222.
3. Darabi, S. and J. Sultani. 2018. Study of quantitative and qualitative traits of new sugar beet cultivars in fields infected with sugar beet cyst nematode. Sugar beet seed breeding research institute. Final Report 54708.
4. Farrokhi, J., R. Darvishzadeh, H. Hatami Maleki, L. Naseri and F. Asghari. 2014. Identification of microsatellite markers linked to morphological and biochemical traits in Iranian native apple (*Malus × domestica*. Borkh) cultivars. *Journal of Agricultural Biotechnology- Research and ISC*. 2014: 117-128.
5. Hamidi, H. and M. Ahmadi. 2018. Evaluation of genetic diversity of sugar beet semi-sister lines under field moisture stress. *Journal of Crop Breeding*, 10(28): 145-154.
6. Izzatullayeva, V., Z. Akparov, S. Babayeva, J. Ojaghi and M. Abbasov. 2014. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet. *Turkish Journal of Biology*, 38(4): 429-438.
7. Karim, M.R., H. Sabouri and M.A. Ebrahimi. 2019. The relationship of ISSR markers to agronomic traits in rice under flooding and drought conditions. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 32(1): 87-97
8. Keykhosravi, H. 2017. Evaluation of Genetic Diversity in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Genotypes Using ISSR Markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, 9(2): 127-141.
9. Kouchaki, A. and A. Sultani. 1996. Sugar beet cultivation. Publisher of Jihad Daneshgahi.
10. Mandoulakani, B., H. Azizi, Y. Piri, S. Rahmanpour and L. Hassani. 2016. Association Analysis for Morphological Traits in Cultivated Alfalfa using Molecular Markers. *Journal of Crop Breeding*, 8(19)-Autumn 2016.
11. Rahimi, M. 2018. Using stepwise regression to identify ISSR molecular markers associated with agronomic traits in ispaghula (*Plantago ovata* Forssk) ecotypes. *New findings in biological sciences*. 2018: 128-136.
12. Rajabi, A. and F. Taleghani. 2015. The study drought tolerance in half-sib families multigerm diploid sugar beet in field conditions. Sugar beet seed breeding research institute. Final Report 49020.
13. Sultani, J. and A. Rajabi. 2019. Investigation of agronomic characteristics of foreign sugar beet cultivars in a field infected with sugar beet cystic nematode. Sugar beet seed breeding research institute. Final Report 55992.
14. Taški-Ajduković, K., N. Nagl, Ž. Čurčić and M. Zorić. 2017. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnolo. Pakistan Journal of Botany*, 51(1): 11-17.

Evaluation of Traits and Genetic Diversity of Sugar Beet O-Type Lines for Rhizomania Tolerance using SSR Molecular Marker

Fereshte khorsandi¹, Seyed Hassan Marashi², Masoud Ahmadi³ and Farajolah Shahriari Ahmadi⁴

1- Graduated M.Sc. Student, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture,
(Corresponding author: s.khorsandi89@gmail.com)

2- Professor Department of Biotechnology and Plant Breeding Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture

3- Associate Professor of Sugar Beet Research, Khorasan Razavi Agricultural Research and Training Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization

4- Professor Department of Biotechnology and Plant Breeding Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture

Received: 11 February 2021 Accepted: 1 February 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Sugar beet is one of the most important agricultural products in the world and most of the sugar consumed in our country is prepared from this plant. Plant breeding programs are based on creating variety and selection of quantitative and qualitative traits. Examining genetic diversity is the first step in breeding programs.

Material and Methods: In this study, in order to investigate genetic diversity, 30 genotypes of (O-Type lines) with different phenotypic traits were used. This experiment was performed as a randomized complete block design on a farm level. 30 genotypes were examined for morphological traits (growth score, leaf color, root uniformity, root rhizomania, sugar percentage, yield (weight), sugar yield).

Results: The results of statistical analysis of variance of the studied traits showed that genotypes have meaningful differences and variation in terms of all measured traits. Also, Genotypes were examined by 10 pairs of SSR primers, which showed 3 polymorphic primers out of 10 SSR primers. These three primers were examined in terms of band pattern and bands were scored based on the presence or absence (zero and one) and the similarity matrix was used to better understand the similarities and differences. The results showed that among the 3 primers studied, SB06 primer showed 100% polymorphism, which can be concluded that this marker shows diversity better. In addition to evaluating traits and genetic diversity using SSR molecular markers, in order to determine the relationship between morphological traits and molecular data and identify markers that are associated with these traits, stepwise regression was performed. The results of stepwise regression analysis showed that there is a significant relationship between traits and some gene loci of the studied primers. The gene locus of SB06-1 primer was associated with the highest number of traits. They showed the highest correlation between SB06-1, SB06-3 primer gene loci and root uniformity trait ($r = 0.40^{**}$) at 1% level.

Conclusion: With the results of correlation analysis, it can be concluded that the gene locus of SB06-1 primer for SSR primer showed the highest correlation with traits. Therefore, these markers can be used to study genetic diversity and relationship analysis in the study of sugar beet breeding programs and use them in marker selection. The results of this study showed that SSR markers can differentiate sugar beet genotypes and show genetic diversity well. Therefore, these markers can be used in correction programs. The results of this study showed that SSR markers can differentiate sugar beet genotypes and show genetic diversity well, so these markers can be used in breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, Morphological traits, Sugar beet, SSR marker