

شناسایی گیاهان متحمل و حساس به خشکی در هیبریدهای چغندر قند 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، نسرين 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 چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان
رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

Ghanbari S¹, Moshtaghi N^{*2}, Ahmadi M³, Mirshamsi Kakhki A²

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 مهم ترین تنش های غیر زیستی است که تولید محصولات زراعی را در جهان محدود کرده است. شناسایی ژنوتیپ های برتر محصولات زراعی خصوصاً از نظر تحمل به خشکی، گام مهمی در برنامه های به نژادی می باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی در انتخاب ژنوتیپ های برتر سبب کاهش مدت زمان اصلاح و هزینه پروژه های اصلاحی می شود. در این تحقیق ۲۰ هیبرید چغندر قند 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 نواری با یک و صفر نشان داده شدند و تجزیه های آماری صورت گرفت. شاخص های بررسی تنوع ژنتیکی نشان داد که بیشترین تنوع در آغازگر SSR و RAPD به ترتیب مربوط به آغازگر BQ583448 (۷۶٪) و آغازگر J (۴۴٪) بود. تجزیه خوشه ای براساس داده های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام شد. با توجه به بررسی های صورت گرفته بر روی تجزیه خوشه ای شاخص STI (Stress Tolerance Index) (حاصل مطالعات قبلی) و نشانگرهای مولکولی استفاده شده، مشاهده شد که از میان های نشانگرهای SSR استفاده شده در این تحقیق، آغازگر BQ583448 و آغازگر FDSB502 از میان نشانگرهای RAPD، آغازگرهای J و A سبب تفکیک ژنوتیپ های حساس و متحمل به خشکی شدند. بررسی تنوع ژنتیکی از نظر تحمل به خشکی با نشانگر SSR تا حدودی مفید بوده و این نشانگر می تواند در برنامه های بهبود تحمل به خشکی در چغندر قند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی

تنوع ژنتیکی
چغندر قند
خشکی
نشانگر

مقدمه

تنش خشکی یکی از عوامل تهدید اصلی برای کاهش عملکرد اغلب محصولات زراعی است. در این بین چغندرقد 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 توسعه 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 به خشکی، مستلزم شناسایی اساس ژنتیکی و جایگاه ژنومی (QTL) صفات مرتبط با تحمل به خشکی می‌باشد. چغندرقد با نام علمی *Beta vulgaris* گیاهی دو ساله از خانواده اسفناجیان است که از مهم‌ترین گیاهان صنعتی و جزو دو منبع مهم گیاهی تأمین‌کننده شکر به‌صورت اقتصادی است (Joersbo 2007). طول دوره رشد چغندرقد، 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 چغندرقد انجام شده است. در پژوهشی که به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۳ ژنوتیپ چغندرقد با استفاده از ۱۴ آغازگر SSR انجام شد، مشخص شد که ۱۴ آغازگر، ۸۸ باند را با دامنه اندازه‌های ۱۲۴ تا ۱۲۲۲ جفت‌باز با محدوده‌ی PIC زیاد و کم (۰/۸۵، ۰/۶۲۵) تولید کردند (Srivastava et al. 2017). (Ćurčić et al. 2017) بر روی تنوع ژنتیکی و ارتباط آن با گرده افشانی در چغندرقد با استفاده از نشانگر SSR تحقیقی انجام دادند. در بررسی آن‌ها حدود ۱۴۰ نمونه از ۱۲ لاین شامل لاین‌های بارور و نرعیتم سیتوپلاسمی استفاده شدند، در کل ۱۲۹ باند با میانگین ۲ تا ۳ باند در هر نشانگر SSR به‌دست آمد. در بررسی آن‌ها ۷۷/۴۴ 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 چغندرقد 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 ۹۰ و ۱۴ نشانگر RAPD و ISSR برای شناسایی این نواحی ژنومی مورد استفاده قرار گرفت. از ۱۴ آغازگر RAPD، یک آغازگر RAPD با پلی‌مورفیسم ۱۸/۶ درصد برای تفکیک ارقام حساس و متحمل به خشکی شناسایی شد. از ۹۰ آغازگر ISSR، فقط ۳ آغازگر ISSR، پلی‌مورفیسم را در ارتباط با ویژگی تحمل به خشکی نشان دادند و پلی‌مورفیسم ۲۱/۳۸ درصد را نشان دادند. در مطالعه‌ی 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 مجموع ۷۲ باند با استفاده از ۶ آغازگر RAPD ارزیابی شدند که ۶۱ درصد آن‌ها مونومورف و ۳۸ درصد پلی‌مورف بودند و ژنوتیپ Sham-6 با داشتن باند ۶۰۰ 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 افشان S1 از یک جمعیت آزادگرده افشان چغندرقد، از ۷۶ لاین S1 (دارای خویش آمیزی) چغندرقد استفاده شد. تست کراس بین لاین‌های تولید شده به‌عنوان پایه گرده افشان و هیبرید ساده (سینگل کراس) نر عقیم سیتوپلاسمی انجام شد. نتایج حاصل از این 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 چغندرقد تنوع برای تحمل به خشکی 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

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 چغندرقدن شامل ۱۶ هیبرید تاپ کراس و ۴ هیبرید تجاری به عنوان شاهد استفاده شد (جدول ۱). این ژنوتیپ‌ها در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی بخش تحقیقات چغندرقدن از نظر تحمل به خشکی در مطالعه Ahmadi et al. (2018) مورد ارزیابی قرار گرفته بودند و از شاخص تحمل به خشکی STI (Stress Tolerance Index) برای تعیین تحمل ژنوتیپ‌های چغندرقدن استفاده شده بود. در بررسی آن‌ها میزان عملکرد ژنوتیپ‌ها در دو شرایط نرمال و تحت تنش به همراه 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 می‌گرفت و در شرایط تنش پس از ۲۰۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک،

آبیاری انجام شد. در تحقیق حاضر ۲۰ ژنوتیپ چغندرقدن با استفاده از ۱۰ آغازگر SSR (جدول ۲) و ۹ آغازگر RAPD (جدول ۳) 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 $PIC = 1 - \sum p_i^2$ 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 ازلت مایع به فریزر -۸۰ جهت نگهداری منتقل شدند. به منظور استخراج DNA از روش CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید) استفاده شد و برای بررسی کیفیت و کمیت DNA 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 چغندرقدن بودند و همچنین از آغازگرهای RAPD استفاده شد (جدول ۳).

جدول ۱- هیبریدهای چغندرقدن 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
SBS17	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
SBS14	شاهد رقم پاپا (هیبرید تجاری)	20	Hybrid 44	CMS × Pollinator 44	10

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

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

جدول ۳- توالی آغازگرهای RAPD (شرکت سیناژن)

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

شد. (Abbasi and Majidi 2015) محصولات PCR به دلیل تفکیک پذیری بهتر آغازگرها بر روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی، 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 نرم افزار 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 نرم افزار NTSYS و روش UPGMA انجام شد و دندروگرام مربوطه رسم شد.

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

برای انجام واکنش PCR از مسترمیکس ۲X 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 ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ 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

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که استخراج DNA به روش CTAB برای نمونه‌های برگ‌ی چغندر قند به خوبی انجام گرفت. غلظت DNA در بهترین شرایط تا هزار نانو گرم در میکرولیتر بود. همچنین نسبت جذب در طوج موج ۲۶۰ به ۲۸۰ به طور متوسط بین ۱/۵ تا ۲ بود. بررسی کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که DNAهای استخراجی از کیفیت مطلوبی برخوردارند. از ۱۰ آغازگر SSR استفاده شده، ۹ آغازگر چندشکلی بالایی را نشان دادند و در ادامه از آنها برای آنالیز استفاده شد (شکل ۱). 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 به ترتیب آغازگر BQ583448 با ۰/۷۶ و آغازگر J با ۰/۴۴ را دارا بودند (جدول ۴ و ۵). به طور کلی بالا بودن میزان PIC آغازگرها بیانگر کارایی بالای این آغازگرها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشد (Ren and timko 2001).

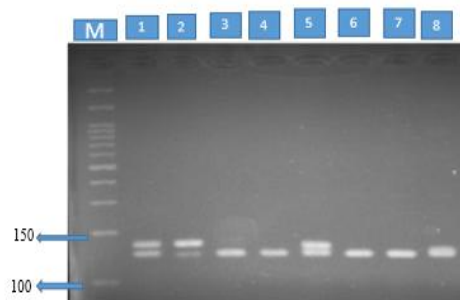
تجزیه خوشه‌ای: تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها یا افراد کاربرد دارد. در این نوع تجزیه، فواصل ژنتیکی به منظور مشخص نمودن دوری و نزدیکی افراد از نظر ژنتیکی، محاسبه می‌شوند و سپس نمودار درختی (Dendrogram) ترسیم می‌شود. به منظور گروه‌بندی ارقام براساس داده‌های SSR و RAPD از نرم‌افزار NTSYS استفاده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

جدول ۴- مشخصات و اطلاعات مرتبط با آغازگرهای SSR

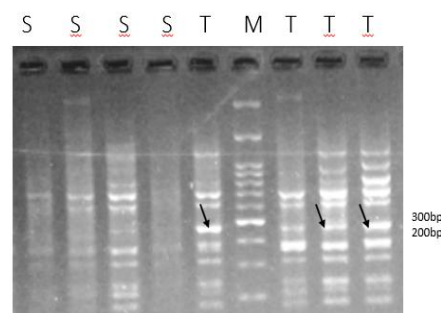
شماره	نام آغازگر	تعداد باندهای مشاهده شده	درصد باندهای چند شکل	دامنه اندازه باندها (bp)	PIC
1	SB15	3	66	100-200	0.52
2	FDSB502	4	50	200-600	0.69
3	FDSB1011	2	100	100-200	0.42
4	SB04	3	100	100-200	0.68
5	SB06	3	100	100-200	0.64
6	FDSB568	3	100	200-300	0.65
7	FDSB990	1	-	200-300	-
8	521.6	4	100	100	0.63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

جدول ۵- مشخصات و اطلاعات مرتبط با آغازگرهای RAPD

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	100-200	0.37
5	I	5	80	200-600	0.32
6	J	6	66	100-800	0.44
7	C	3	80	100-500	0.32
8	D	3	80	100-500	0.32
9	B	4	80	300-500	0.32
10	A	4	75	200-600 300-800	0.37



ب



الف

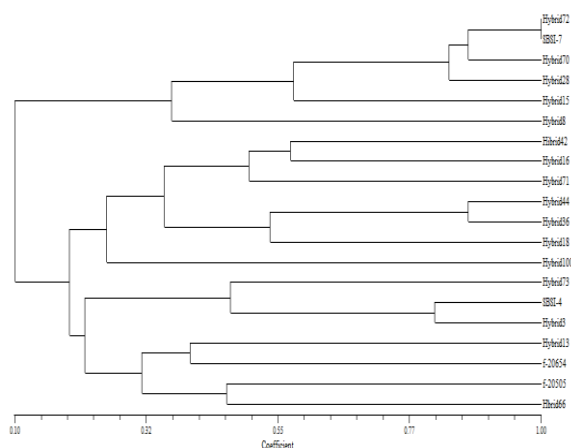
شکل ۱- الف) الگوی نواریندی آغازگر FDSB502 بر روی ۸ نمونه چغندرقد، بر روی ژل آگارز دو درصد، ترتیب نمونه‌ها از چپ به راست (Hybrid100، Hybrid66، Hybrid8، Hybrid3، Hybrid18، Hybrid42، Hybrid44، Hybrid28)، همراه با M (۴/۵ ماکرولیتر از نشانگر 100 bp plus)، ب) تفکیک ارقام متحمل و حساس توسط پرایمر J (S: نشانگر هیبرید حساس به خشکی، T: نشانگر هیبرید تحمل به خشکی، M: نشانگر اندازه)، نام و ترتیب هیبریدها از چپ به راست (SBSI-، Hybrid70، F-20654، Hybrid66، Hbrid15، Hybrid3، Hybrid16، Hybrid73، 4).

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).

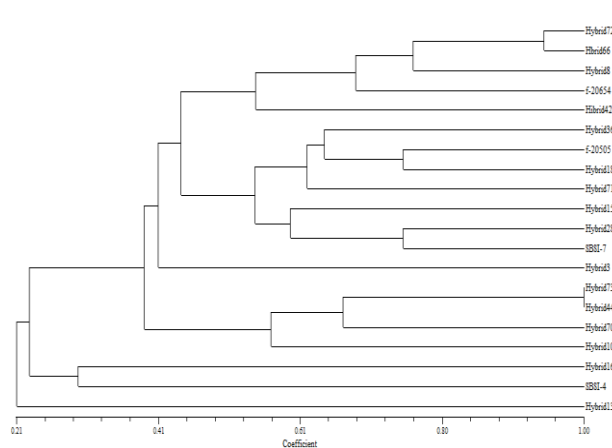
براساس تجزیه به مؤلفه اصلی برای آغازگر SSR، مؤلفه اول (PC1) ۲۰ درصد، مؤلفه دوم (PC2) ۱۶/۵ درصد و مؤلفه سوم (PC3) ۱۵/۲۵ درصد و همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای آغازگر RAPD مؤلفه اول (PC1) ۴۲/۵ درصد، مؤلفه دوم (PC2) ۱۲/۷ درصد و مؤلفه سوم ۸/۹۲ درصد از کل تنوع را توجیه می‌نمود (شکل ۳)، که نشان‌دهنده نمونه‌برداری نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد.

در هر دو دندروگرام، تعیین خط برش با استفاده از روش مبنا (به‌صورت دستی)، و سطح شباهت تقریباً 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 Hybrid72، Hybrid66، Hybrid8، F-20654، Hybrid42، Hybrid36، F-20505، Hybrid18، Hybrid71، Hybrid15، Hybrid28، SBSI-7، Hybrid70، Hybrid44، Hybrid73، Hybrid3، Hybrid100 در یک گروه قرار گرفتند، در گروه دوم هیبرید تجاری SBSI-4 و Hybrid16 و در گروه سوم هیبرید Hybrid13 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، Hybrid100، Hybrid18، Hybrid36 در گروه دوم قرار گرفتند. در گروه سوم هیبریدهای Hybrid73، SBSI-4، Hybrid3 و در گروه چهارم هیبریدهای Hybrid13، F-20654، F-20505، Hybrid66 قرار گرفتند. (شکل ۲)

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.

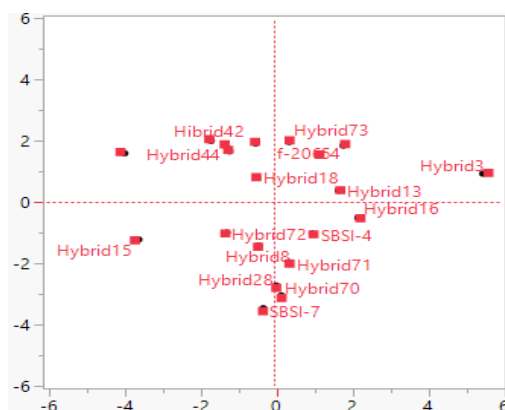


شکل A

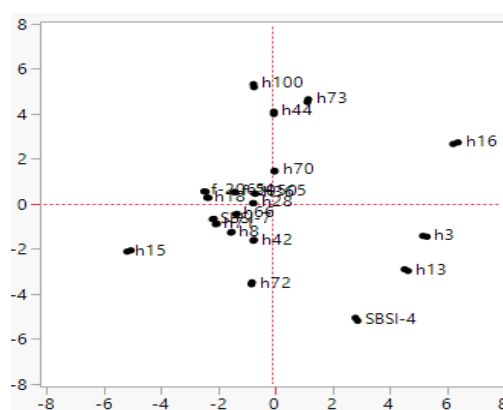


شکل B

شکل ۲- A و B به ترتیب دندروگرام نشانگر SSR و RAPD به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد



شکل B



شکل A

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

Hybrid 72، Hybrid 18) و گروه سوم شامل ۶ هیبرید (Hybrid 71، Hybrid 13، Hybrid 3، Hybrid 16، Hybrid 73، Hybrid 7) می‌باشند. (شکل ۴).

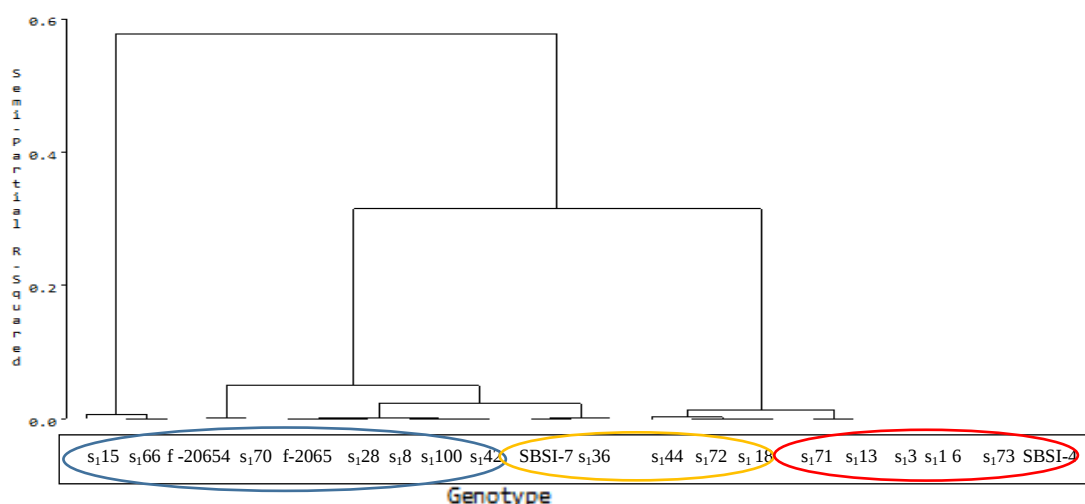
نتایج حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای بر اساس بیشترین و کمترین عملکرد ریشه با توجه به شاخص STI نشان داد که هیبرید Hybrid15 متحمل‌ترین و هیبرید SBSI-4 حساس‌ترین هیبرید می‌باشند، لذا در کل از هیبریدهای گروه اول برای ادامه برنامه‌های اصلاحی تحمل به خشکی می‌توان بهره برد.

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

بررسی ارتباط بین آغازگرهای RAPD و SSR 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 ۶) که گروه اول شامل ۹ هیبرید (Hybrid 15، Hybrid 66، Hybrid 70، f-20654، Hybrid 73، Hybrid 16، Hybrid 3، Hybrid 13، Hybrid 7) می‌باشند، گروه دوم شامل ۵ هیبرید (هیبرید تجاری SBSI-7، Hybrid 36، Hybrid 44، Hybrid 42، Hybrid 100)، گروه سوم شامل ۱۰ نشانگر RAPD، پلات تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای ۱۰ نشانگر SSR

جدول ۶- ترتیب نمونه‌های استفاده شده در تجزیه خوشه‌ای براساس شاخص STI (Ahmadi et al. (2018)

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 ۴- تجزیه خوشه‌ای به منظور 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) (Ahmadi et al. (2018)

در ۲۴ لاین ذرت با استفاده از ۱۰۰ نشانگر مولکولی SSR، در مجموع ۴۶۵ 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 در شناسایی نشانگرهای متحمل به خشکی در ذرت شود (Ullah et al. 2018). در پژوهشی به منظور 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 ۱۰ رقم برنج برای یافتن ارقام متحمل به خشکی با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR، از ۱۶ آغازگر RAPD، ۵ آغازگر

لازم به ذکر است بررسی نتایج حاصل از آغازگرهای SSR در تفکیک ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی بر روی ژل آگارز با استفاده از لدر 100bp شرکت دنایست (با توجه به اینکه کمترین باند لدر ۱۰۰bp 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 ۴۸ مورد باقی‌مانده مابین این دو بودند در مجموع دو آغازگر BQ583448 و FDSB502 به طور قابل توجهی باعث تمایز هیبریدهای حساس و متحمل به خشکی در هیبریدهای چغندر قند مورد آزمایش شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از نشانگر مولکولی SSR برای شناسایی ارقام متحمل یا حساس به خشکی چغندر قند تا حدی مفید خواهد بود. در تحقیقی بر روی تجزیه و تحلیل بهبود تحمل به خشکی دانه

مانتل با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام شد و همبستگی زیادی بین کلاسترهای مولکولی با کلاستر حاصل از شاخص STI حاصل نشد که می توان 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 کنترل کننده صفات مورد بررسی و نشانگرهای مورد استفاده برای تخمین فاصله ژنتیکی به دست نیاید.

پلی مورفیسم نشان دادند که در این بین آغازگرهای RAPD OPA-05 و OPA-11 بیشترین درصد پلی مورفیسم را نشان دادند. در مطالعه ای دیگر، پژوهشگران با استفاده از نشانگرهای SSR به عنوان ابزاری برای غربالگری ژنوتیپ های ذرت برای تحمل به خشکی بر روی شش والد و سی نتاج در نسل اول استفاده کردند که در نتیجه مشخص شد ۷ آغازگر به طور قابل توجهی باعث تمایز ژنوتیپ های متحمل به خشکی و حساس به خشکی در ذرت می شوند (Bawa et al. 2015). لازم به ذکر است که آزمون

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, Yousefabad 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, Hinch 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 criteria for assessing plant stress tolerance. In: Kuo CG (Ed), *Proceedings of the International 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

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.