



ارزیابی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *Beta vulgaris* subsp. *maritima* با استفاده از نشانگرهای مولکولی هسته و سیتوپلاسم

Evaluation the genetic diversity of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* samples using nuclear and cytoplasmic molecular markers

عاطفه نصیری^۱، اصغر میرزائی اصل^{۲*}، محسن آقایی زاده^۳ و علی دلجو^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵

نوع مقاله: پژوهشی

DOI: 10.22092/JSB.2022.357147.1295

ع. نصیری، ا. میرزائی اصل، م. آقایی زاده و ع. دلجو. ۱۴۰۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *Beta vulgaris* subsp. *maritima* با استفاده از نشانگرهای مولکولی هسته و سیتوپلاسم. چغندرقد، ۳۷(۲): ۱۵۱-۱۳۹

چکیده

چغندر ماریتیما (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) نقش مهمی در برنامه‌های به‌نژادی چغندرقد دارد و تحقیق در مورد تنوع ژنتیکی آن اهمیت زیادی دارد. تعداد ۱۳ نمونه چغندر ماریتیما شامل ۱۰ نمونه ایرانی و سه نمونه اروپایی در این تحقیق ارزیابی شدند. دو نوع نشانگر مولکولی ISSR و ماهوارک (minisatellite) برای بررسی ژنوم هسته و میتوکندری مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۱۷۶ مکان با ۱۳ آغازگر شناسایی شد که ۱۴۷ مورد (۸۴/۲۷ درصد) چندشکلی نشان دادند. نتایج مشخص نمود که در بین نمونه‌ها ارزش محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) به میزان ۳۲ درصد است. آغازگرهای (AC)8YT و (GA) 8YC بیشترین میزان ارزش PIC (۳۸٪) را داشتند. آغازگر (CT)8RG با بیشترین شاخص نشانگر (MI) می‌تواند برای تجزیه‌های بیشتر مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس نتایج تجزیه‌های UPGMA و ANOVA همه نمونه‌ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA) با دندروگرام تنوع ژنتیکی نشان داد که نمونه‌های ایرانی و اروپایی از یکدیگر متفاوت هستند. برای مطالعه تنوع سیتوپلاسمی، از چهار نشانگر ماهوارک استفاده شد. نمونه‌ها به چهار گروه میتوکندریایی بر اساس تنوع آغازگرها تقسیم شدند. با توجه به نتایج توالی‌یابی برخی نمونه‌های ایرانی هتروپلاسمی بودند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، چغندر ماریتیما، ماهوارک، نشانگر ISSR، هتروپلاسمی



مقدمه

جنس بتا به خانواده آماراتاسه تعلق دارد (Grimmer *et al.* 2007). منشا بسیاری گونه‌ها در این جنس از جنوب غربی آسیا هستند (Biancardi *et al.* 2005). علاوه بر این در سایر مطالعات ساحل دریای سرخ، ساحل جنوب شرقی دریای سیاه، ارمنستان، قفقاز، ساحل دریای خزر، ایران و هندوستان مناطق اولیه جنس بتا هستند که توسط بیانکاردی و همکاران معرفی شدند. (Bincardi *et al.* 2005) نمونه‌های چغندر وحشی در شمال شرق اروپا، در امتداد سواحل مدیترانه اروپا و آفریقا گسترده شده و تا ایران، هندوستان، چین و سایر کشورهای آسیایی ادامه یافته است. (Arjmand *et al.* 1991) گونه ولگاریس علفی، دو لپه‌ای، هالوفیت و گیاه دیپلوئید است. گیاه چغندرقند دو ساله و به ندرت چند ساله است. اگرچه زیرگونه ماریتیما (*maritima*) معمولاً یک ساله است (Arumuganathan *et al.* 1991) زیرگونه ماریتیما منشا چغندرقند است و شناخت بهتر آن می‌تواند برای افزایش میزان رشد و برنامه‌های اصلاحی این گیاه صنعتی مفید باشد. چغندرقند تلاقی سازگار با چغندر ماریتیما دارد. چغندر وحشی دریایی نیای چغندرقند است و منبع ژنتیکی مهمی برای اصلاح چغندرقند شامل تنش‌های زنده و غیرزنده و نرعیمی سیتوپلاسمی است. موفقیت در برنامه اصلاحی بستگی زیادی به توانایی تولید و شناسایی تنوع ژنتیکی و مهارت در انتخاب ژنوتیپ‌ها در شرایط محیطی خاص است (Biancardi *et al.* 2005). ساختار ژنتیکی گیاهان نتیجه برهمکنش ژنتیک و محیط در محدوده زمانی طولانی است، بنابراین الگوی با ارزشی از ژنتیک و محیط در این گیاهان در دست ما است (Kato *et al.* 2003; Kumar 1999).

مطالعات زیادی برای ارزیابی ژرم پلاسم‌های بومی و گونه‌های وحشی در ایران انجام شده است. مطالعه گونه‌های وحشی در جنس بتا در ایران از سال ۱۹۹۳ با جمع‌آوری بذور از نقاط مختلف کشور انجام شده است (Arjmand *et al.* 1996). نشانگرهای

DNA انتخاب ایده‌آلی برای تجزیه تنوع ژنتیکی گیاهان است (Kummar 1999).

دانش تنوع ژنتیکی برای انتخاب دقیق والدین خوب در تولید هیبریدهای قوی بسیار حائز اهمیت است. ارزیابی تنوع ژنتیکی با نشانگرهای DNA برای شناسایی و بررسی واریته‌ها و خصوصیات اکولوژیکی و فیلوژنتیکی بکار میرود (Kummar 1999, sharma *et al.* 1999). نشانگر ISSR (توالی‌های بین توالی‌های تکراری ساده) یک نشانگر غالب با کاربرد سریع، ساده و مؤثر است. تکنیک ISSR قطعات DNA بین دو توالی مشابه ریزماهواره‌ای را تکثیر می‌کند که در جهت عکس هم هستند (Meyer *et al.* 1999, Wu *et al.* 1994). نشانگر ISSR در نشانند کردن ژن (Joshi- Saha and Gopalakrishna 2007)، مطالعات تنوع ژنتیکی (Kozyrenko *et al.* 2009; Sehgal *et al.* 2011) انگشت نگاری (Bhagyawant and Srivastava 2008)، نقشه‌یابی ژنوم (Venkateswarlu *et al.* 2006)، شناسایی ژنتیکی (Martins-lopes *et al.* 2007)، شناسایی ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزیگوت (Sankar and moore 2001)، انتخاب به کمک نشانگرها (Vijayan *et al.* 2006) و تشخیص مکان‌های صفات کمی (Hashizume *et al.* 2003) چندشکلی DNA سیتوپلاسمی برای بررسی جریان ژنی، شناسایی شجره والدین با نگاه توارث مادری و تکامل ژنتیکی (Dumolin- lapegue *et al.* 1998, McCauley 1995) استفاده شده است. بررسی DNA میتوکندریایی برای انگشت‌نگاری نرعیمی سیتوپلاسمی در برنامه‌های اصلاحی چغندرقند، تعیین تنوع سیتوپلاسمی در نمونه‌های ژرم‌پلاسم و شناسایی نرعیمی سیتوپلاسمی جدید، مفید است. دسپلانگ و همکاران (Desplanque *et al.* 2000) رابطه‌ای بین DNA میکروپلاستی و میتوکندریایی در چغندر ماریتیما پیدا نکردند و هر دو ژنوم برای مطالعات ژنتیک مادری مناسب هستند و جمعیت‌های چغندر در ۱۲ اکوتیپ دسته‌بندی شدند. اسمولدر و همکاران (Smulders *et al.*

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد ده نمونه (m1 تا m10) چغندر زیرگونه ماریتیما استفاده شده در این مطالعه، توسط مؤسسه تحقیقات چغندرقد واقع در کرج فراهم گردید. منشأ جغرافیایی در جدول ۱ نشان داده شده است. تعداد سه نمونه اروپای m11 از فرانسه، m12 از یونان و m13 از ایتالیا به عنوان شاهد استفاده شدند.

(2010) تنوع ژنتیکی *B. vulgaris* دیپلوئید و تریپلوئید را با ۱۲ نشانگر ریزماهواره بررسی کردند. توسعه تنوع ژنتیکی چغندر با نشانگرهای مختلفی شناسایی شده است، اما با نشانگر ISSR انجام نشده است. در این تحقیق، این نشانگر برای تعیین تنوع ژنتیکی ۱۳ نمونه چغندر زیرگونه ماریتیما که ده مورد از آن از ایران جمع‌آوری شده و سه مورد آن اروپایی است، استفاده گردید، همچنین تنوع ژنتیکی همه سیزده نمونه زیرگونه ماریتیما از طریق DNA هسته و میتوکندری با تکثیر ISSR و مکانی‌های ماهوارک (Minisatellite) بررسی شد.

جدول ۱ منشأ جغرافیایی نمونه‌های چغندر ماریتیما (*Beta vulgaris* supsp. *maritima*)

کشور	منطقه	شماره نمونه	طول و عرض جغرافیایی
ایران	صفی آباد (A)	m1	32°15'N/48°24'E
ایران	میناب	m2	27°8'N/57°4'E
ایران	سرخان	m3	32°22'N/48°25'E
ایران	دبلم	m4	32°22'N/48°25'E
ایران	شوش	m5	32°11'N/48°14'E
ایران	دزفول	m6	32°22'N/48°25'E
ایران	مغان	m7	39°17'N/47°37'E
ایران	گرمی	m8	39°1'N/48°4'E
ایران	فکان	m9	32°22'N/48°25'E
ایران	صفی آباد (B)	m10	32°15'N/48°24'E
فرانسه	Normandy	m11	48°52'N/0°10'E
یونان	Kefalonia	m12	38°10'N/20°34'E
ایتالیا	Sardinia	m13	40°7'N/9°0'E

تکثیر ماهوارک‌ها

مطابق نیشیزاوا و همکاران (Nishizawa et al. 2000)، چهار جفت آغازگر برای تکثیر PCR از مکان‌های ماهوارک (Minisatellite) میتوکندریایی TR1، TR2، TR3 و TR4 استفاده شد. چهار گروه مکان ماهوارک در چغندر با تعداد تکرارهای متفاوت پشت سر هم میتوکندریایی (mtVNTR) به ترتیب با طول‌های ۳۲، ۳۳، ۶۶ و ۳۰ جفت باز شناخته می‌شوند.

تکثیر PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل کلرید منیزیم سه میلی مولار dNTPها هر یک ۰/۴ میلی مولار هر آغازگر با ۰/۴

استخراج DNA و تکثیر PCR

از هر نمونه برگ‌های جوان ۱۰ بوته از مزرعه آزمایشی دانشگاه بوعلی سینا همدان برای استخراج DNA برداشت شد و با هم به میزان مساوی مخلوط گردیدند تا نمونه‌های یکنواخت از ژرم‌پلاسم فراهم گردد. نمونه‌ها با نیتروژن مایع پودر شدند. استخراج و خالص‌سازی DNA کل با استفاده از روش بهبود یافته CTBA بر اساس Cai و همکاران انجام شد (Cai et al. 1997).

ژل آگارز ۳ درصد، بافر TBE و با ولتاژ ۸۰ به مدت سه ساعت تفکیک شد.

تکنیر ISSR

تعداد ۲۰ آغازگر ریزماهواره از شرکت بایولژیو (Biolegio, (Nijmegen, Netherlands)) تهیه شد. همه ۲۰ آغازگر ISSR غربال شدند و بر اساس تکرارپذیری و چندشکلی تولید شده، تعداد ۱۳ آغازگر ISSR در نهایت انتخاب شدند (جدول ۲).

پیکومول، آنزیم DNA پلیمرز Taq به میزان یک یونیت، بافر PCR به میزان ۵/۲ میکرولیتر و DNA ژنومی به میزان ۱۰۰ نانوگرم در حجم نهایی بود.

شرایط PCR در دماها و زمان‌های شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در آخر گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در

جدول ۲ مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنوم هسته چغندر ماریتیم

آغازگر	توالی	دما (سانتی‌گراد)	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چندشکلی	درصد چند شکلی	PIC value	MI value
P1	(AG)8T	۵۴	۱۴	۱۲	۸۵/۷۱	۰/۳۱	۳/۱۸
P2	(AG)8YT	۵۲	۱۵	۱۳	۵۶/۶۶	۰/۳۰	۳/۳۸
P3	(AC)8YT	۵۲	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳	۰/۳۸	۳/۱۶
P4	(CA)8G	۵۳	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳	۰/۲۹	۲/۴۱
P5	(CT)8RC	۵۴	۱۶	۱۴	۸۷/۵۰	۰/۳۱	۳/۷۹
P6	(CT)8RG	۴۲	۱۷	۱۵	۸۸/۲۳	۰/۳۲	۴/۲۳
P7	(GA)8C	۵۲	۱۱	۱۰	۹۰/۹۰	۰/۲۶	۲/۳۶
P8	(GA)8T	۵۲	۱۲	۹	۷۵/۰۰	۰/۳۷	۲/۴۹
P9	(GA)8YC	۵۲	۱۹	۱۴	۷۳/۶۸	۰/۳۸	۳/۹۲
P10	(TC)8C	۵۴	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳	۰/۳۴	۲/۸۳
P11	(TG)8A	۵۲	۹	۸	۸۸/۸۸	۰/۳۷	۲/۶۳
P12	(TG)8G	۵۲	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳	۰/۳۶	۳/۰۰
P13	GGGC(GA)8	۵۵	۱۴	۱۲	۸۵/۷۱	۰/۲۶	۲/۶۷
SUM	-	-	۱۷۵	۱۴۷	-	-	-
Mean	-	-	۱۳/۴۶	۱۱/۳	۸۴	۰/۳۲	۳/۰۸

(Annealing Temperature=Ta, R=A/G, Y=C/T)

۵۵ درجه سانتی‌گراد دمای اتصال بسته به آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در آخر گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد در بافر 1x TBE با ولتاژ ۸۰ تفکیک شد. همه نتایج PCR برای تکرارپذیری حداقل سه بار بررسی شدند.

امتیازدهی و تجزیه داده‌ها

تکنیر PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل کلرید منیزیم سه میلی مولار، هر dNTP به میزان ۰/۶ میلی مولار، از هر آغازگر ۰/۸ پیکومول و آنزیم DNA پلیمرز Taq به میزان یک یونیت بود. بافر PCR به میزان ۲/۵ میکرولیتر و DNA ژنومی به میزان ۱۰۰ نانوگرم برای هر واکنش اضافه شد.

شرایط PCR شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۴۰ چرخه از ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه،

نتایج

چندشکلی ISSR

اندازه قطعات تکثیر شده PCR از ۱۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متفاوت بود. تعداد ۱۴۷ باند از ۱۷۵ باند قابل بررسی، ۸۴/۲۷ درصد چندشکلی داشتند. تعداد باندهای ایجاد شده توسط آغازگرها از ۱۵ تا ۱۸ مورد، با متوسط ۱۱/۳۸ باند به ازای هر آغازگر بود. تعداد ۱۵ مکان چند شکل با آغازگر p6 در بین ۱۳ نمونه با بیشترین باندهای قابل ارزیابی تکثیر شد، در حالی که آغازگر P11 کمترین تعداد قطعه تکثیر شده با هشت نشان داد. سطح چند شکلی بالای تعیین شده مشخص کرد که نشانگر ISSR سیستم مفیدی است. نشانگر ISSR غالب است و بنابراین حداکثر ارزش PIC بین ۰/۰۱ تا ۰/۵ است. مقدار PIC بالاتر دلالت بر محتوای اطلاعات بیشتر دارد (Ghislain et al. 1999). مقدار PIC از ۰/۲۶ برای آغازگرهای P13 و P7 تا ۰/۳۸ برای آغازگرهای P3 و P9 و متوسط مقدار PIC به میزان ۰/۳۲ بود که مشابه مقادیر سایر منابع منتشر شده برای آغازگرهای ISSR است (Verma and Rana 2011). متوسط مقدار MI برای همه مکانها ۳/۰۸ بود. حداکثر مقدار MI به میزان ۴/۲۳ برای آغازگر P6 و کمترین آن ۲/۳۶ برای آغازگر P7 بود. جزئیات نتایج در جدول ۲ آمده است. ضرایب شباهت جفتی ژنتیکی در میان ۱۳ نمونه چغندر ماریتیما از ۰/۱۴ تا ۰/۷۱ با میانگین ۰/۴۲ بود. که دلالت بر درجه تنوع زیاد در نمونه‌های ایرانی ماریتیما داشت. حداکثر ضریب شباهت ژنتیکی ۰/۷۲ بین نمونه‌های شوش و دزفول بود که هر دو از استان خوزستان منشأ گرفته و به هم نزدیک هستند. کمترین ضریب شباهت جفتی ۰/۱۴ بین نمونه‌های ایتالیا و صفی‌آباد B (M10) بود. علاوه بر این ضریب شباهت جفتی بین دو نمونه ایرانی صفی‌آباد B و مغان با منشأ به ترتیب خوزستان و اردبیل، ۰/۳۴ بود. ضریب شباهت ژنتیکی کم مشخص نمود که تفاوت ژنتیکی بزرگی بین نمونه‌های صفی‌آباد B و مغان وجود دارد که از لحاظ جغرافیایی در شمال و جنوب ایران

در بررسی ژنوم هسته، هر قطعه تکثیر شده به‌عنوان مکان ISSR در نظر گرفته شد. باندهای DNA برای حضور (۱) و عدم حضور (۰) در ISSR امتیازبندی شد. دندروگرامی بر اساس ماتریس شباهت ژنتیکی با استفاده از روش UPGMA رسم شد (sneath and sokal 1973) که بر اساس ضریب شباهت جاکارد (Jaccard 1908) بود. فاصله اقلیدسی بر اساس ضرایب شباهت محاسبه گردید. درصد باندهای چند شکل (PPB) با تقسیم تعداد باندهای چند شکل به تعداد کل باندها، محاسبه شد. تنوع ژنتیکی با ماتریس دوتایی تعیین شد. همه تجزیه‌ها با نرم‌افزار NTSYS-PC نسخه ۲/۱۰e انجام شد (Rehlf 2000). تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) بر ماتریس شباهت ISSR محاسبه شد (semagn et al. 2000). محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) با $q^2 - p^2$ محاسبه شد (semagn et al. 2000) که P فراوانی باند و q فراوانی فقدان باند است (Ghislain et al. 1999).

ارزش PIC احتمال نوترکیبی بین آل‌های متفاوت را نشان می‌دهد و شاخصی برای قدرت هر نشانگر ISSR است (Alem et al. 2011). شاخص نشانگر (MI) برای نشانگرهای ISSR محاسبه شد تا ظرفیت هر آغازگر برای تشخیص مکان‌های چند شکل بین ژنوتیپ‌ها تعیین شود. شاخص نشانگر توسط پاول و همکاران فرموله شد (Powell et al. 1996).

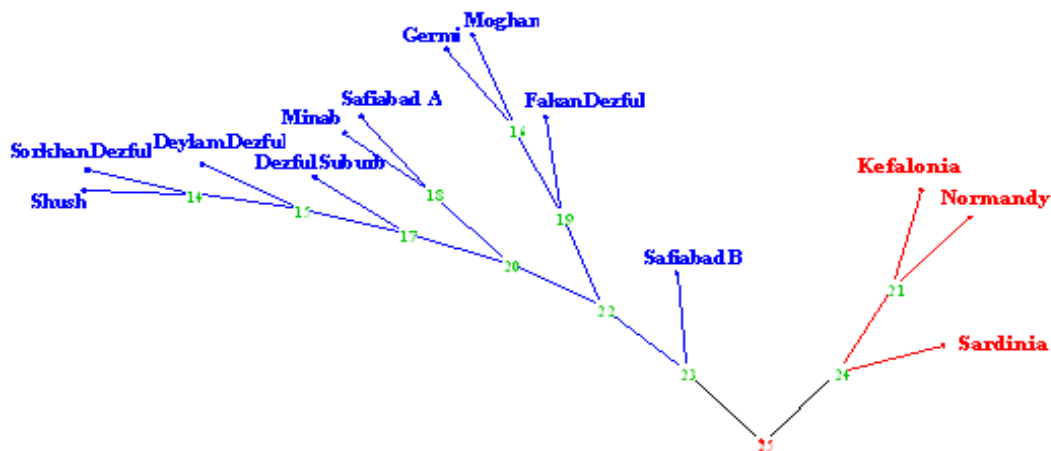
تجزیه تنوع مولکولی (AMOVA) با استفاده از GenAlex نسخه ۶/۳ انجام شد (peakall et al. 2012). برای اطمینان از این که باندهای چندتایی مشاهده شده مربوط به ناحیه تکثیری ماهوارک است، محصول PCR آغازگرهای TR3 بعد از مشاهده باندها در ژل آغازگر ۳ درصد، توالی‌یابی شدند. توالی‌یابی DNA توسط شرکت بایونیر کره (Bioneer, Korea) انجام شد. هم‌ردیفی چندتایی با نرم‌افزار ClustalW انجام شد (Thompson et al. 1994).

دندروگرام UPGMA مشخص نمود که ۱۳ نمونه به طور واضح در دو گروه جدا می‌شوند. گروه اول ترکیبی از نمونه‌های ایرانی در حالی که گروه دوم شامل نمونه‌های اروپایی بود. نتایج نشان داد که شباهت بین دو گروه کم تر از شباهت داخل گروه‌ها است (شکل ۱). تجزیه PCoA توزیع فضایی نمونه‌ها بر اساس تنوع ژنتیکی را اثبات می‌کند. با مقایسه فاصله فضایی و فاصله ژنتیکی، همه نمونه‌ها از لحاظ شباهت به دو گروه ایرانی و اروپایی تقسیم شدند. با تجزیه مختصات اصلی جدایی دو گروه تایید شد (شکل ۲).

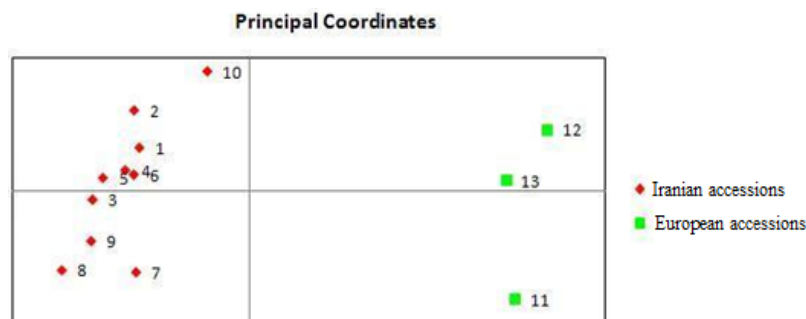
هستند. میانگین ضریب شباهت ۰/۳۶ در نمونه صفی‌آباد B، نسبت به سایر نمونه‌های ماریتیم، تنوع زیادی در ژنوم صفی‌آباد B را نشان می‌دهد. آغازگرهای P7 و P9 به ترتیب بیشترین (۹۰/۹٪) و کم‌ترین (۷۳/۶۸٪) چند شکلی را داشتند. در نتایج تجزیه AMOVA بیشترین تمایز بین گروه‌ها در نقطه برش با دو گروه شباهت با سطح ۰/۳۵ به دست آمد. مطابق الگوی عمومی توزیع تنوع مولکولی نشانگرهای ISSR، واریانس مولکولی ۰/۴۳ مربوط به تفاوت‌های بین گروه‌ها و ۰/۵۷ واریانس مولکولی مربوط به تغییرات داخل گروه‌ها بود (جدول ۳). بر اساس ۱۴۷ باند چند شکلی،

جدول ۳ تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس ۱۳ آغازگر ISSR برای تعیین تعداد گروه‌های مناسب

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	Est. Var.	درصد تغییرات
بین گروه‌ها	۱	۹۴/۸۴	۹۴/۸۴	۱۵/۹۵	۴۳
درون گروه‌ها	۱۱	۲۳۳/۴۶	۲۱/۲۲	۲۱/۲۲	۵۷
کل	۱۲	۳۲۸/۳۰	-	۳۷/۱۷	۱۰۰



شکل ۱ دندروگرام UPGMA بر ضریب جاکارد و نشانگرهای ISSR



شکل ۲ تجزیه به مختصات اصلی دو بعدی ۱۳ نمونه چغندر ماریتیمما بر اساس چندشکلی ISSR

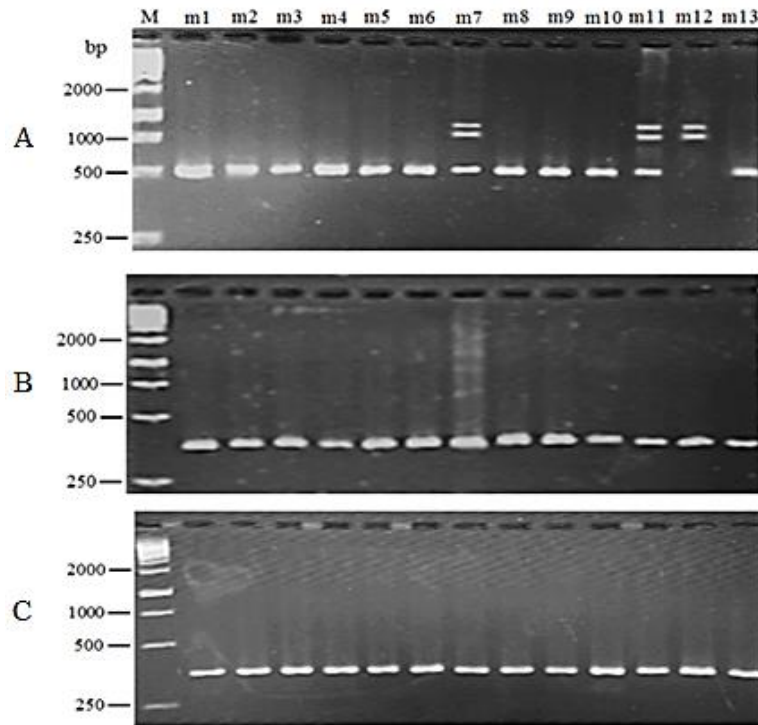
چند شکلی ماهوارک‌های میتوکندریایی

مشاهده شده مربوط به ناحیه تکثیر شده مورد مطالعه است، محصول PCR یک تک بوته از نمونه m1 توالی‌یابی شد (شکل 4B و 4C). دو تا از سه باند (B و C) توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که توالی با شماره دستیابی AB026710 (Nishizawa *et al.* 2000) شباهت زیادی با این باندها دارد. باند B با ۴۴۱ جفت باز دارای واحد تکراری (۶۶ جفت باز) در ناحیه تکراری مشابه با توالی بانک ژن بود. باند C با ۳۷۵ جفت باز دو عدد از همان واحد تکراری را داشت. برآورد شد که قطعه A به طول ۵۰۷ جفت باز با چهار واحد تکراری باشد. این سه قطعه در نمونه‌های m3، m5، m8 و m9 یافت شد. نشانگر TR2 یک باند ۳۶۴ جفت بازی در همه نمونه‌ها تکثیر کرد (شکل 3C). در صورتی که در مطالعات قبلی تکثیر چهار قطعه به طول ۳۵۰، ۳۶۴ و ۴۱۰ جفت باز گزارش شده است (Nishizawa *et al.* 2000; Fenart *et al.* 2008). نمونه‌ها بر اساس چند شکلی ماهوارک‌های میتوکندریایی به چهار گروه میتوتایپ تقسیم شدند (جدول ۴).

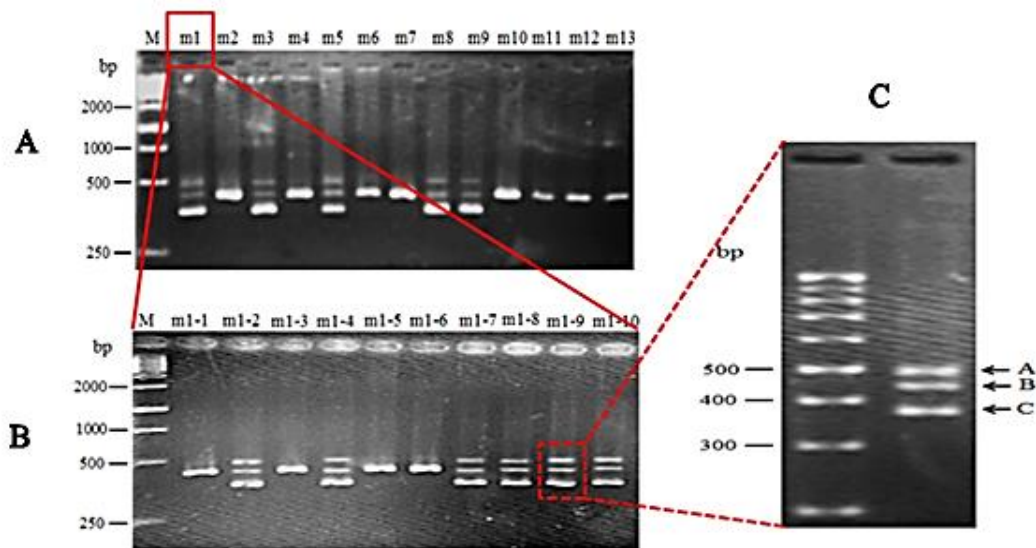
نشانگر TR1 بر اساس نیشیزاوا و همکاران یک قطعه ۵۰۰ جفت بازی در همه نمونه‌ها بجز نمونه m12 تولید کرد (Nishizawa *et al.* 2000). علاوه بر این دو باند در نمونه m12 و سه باند در نمونه‌های m7 و m11 (شکل 3A) تولید شد. اندازه قطعه مورد انتظار ۵۰۰، ۵۶۵ و ۶۹۵ جفت باز بود. تفاوت میتوتایپ‌ها به اندازه باندها بستگی دارد (Fenart *et al.* 2006; 2008). نشانگر TR2 فقط یک باند ۳۶۲ جفت بازی تولید کرد (شکل 3B). در مطالعات قبلی سه باند با ۳۶۲، ۴۰۴ و ۵۰۰ جفت باز با این نشانگر ایجاد شده بود (Nishizawa *et al.* 2000; Fenart *et al.* 2008). به طرز جالبی ما الگوی چند باندی نظیر TR1 در نتایج TR3 مشاهده کردیم. این نشانگر الگوی تک باند و سه باند در میان نمونه‌ها مشاهده شد (شکل 4A). قطعات مورد انتظار TR3 با اندازه‌های ۴۲۰، ۴۴۱ و ۴۸۲ جفت باز بود (Nishizawa *et al.* 2000; Fenart *et al.* 2008). برای تضمین اینکه چند باندی

جدول ۴ میتوتایپ‌های حاصل از چندشکلی ماهوارک‌های میتوکندریایی برای نمونه‌های چغندر ماریتیمما

Accession	میتوتایپ	TR1	TR2	TR3	TR4
		(bp)			
m1, m3, m5, m8, m9	A	۵۰۰	۳۶۴	۵۰۷، ۴۴۱، ۳۷۵	۳۶۴
m7, m11	B	۶۹۵، ۵۶۵، ۵۰۰	۳۶۴	۴۴۱	۳۶۴
m12	C	۶۹۵، ۵۶۵	۳۶۴	۴۴۱	۳۶۴
m2, m4, m6, m10, m13	D	۵۰۰	۳۶۴	۴۴۱	۳۶۴



شکل ۳ محصول PCR ۱۳ نمونه چغندر ماریتیما که با آغازگرهای (A) TR1 (B) آغازگرهای (B) TR2 و آغازگرهای (C) TR4 (نمونه‌های چغندر ماریتیما از ۱ تا ۱۳ در جدول ۱ نامگذاری شدند. M: 1Kb DNA ladder)



شکل ۴: (A) ژل آگارز محصول PCR نمونه‌های چغندر ماریتیما تکثیر یافته با نشانگر TR3؛ (B) تکثیر ۱۰ بوته نمونه m1؛ (C) استخراج باندهای DNA از ژل آگارز برای توالی‌یابی

بحث

گروه ایرانی ارتباط کمی با تنوع جغرافیایی نشان داد. این امر احتمالاً به دلیل شباهت نسبی محیط و شرایط اکولوژیکی محل‌ها یا انتقال بین مکان‌های مختلف از طریق بذور ارقام تجاری باشد. به طور کلی، در جمعیت‌های وحشی فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌های تعیین کننده فاصله ژنتیکی هستند. راجع به این جمعیت‌ها، اگر جریان ژنی بین مکان‌های اصلی قطع شود، تحت تأثیر عامل‌های غیرطبیعی نظیر تجزیه محل‌ها که به دلیل برداشت کنترل نشده، چرای بیش از حد و سایر عامل‌ها، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های جدا افتاده را افزایش می‌دهد و فرسایش ژنتیکی بخاطر یکنواخت شدن و تمایز بین جمعیت آغاز می‌شود (Martins-lopes *et al* 2007). برای بررسی تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی باید چند شکل باشند و یکنواخت در کل ژنوم توزیع شده باشند. بنابراین، اگر نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند، همبستگی بین آنها کمتر خواهد شد و ترکیبات بیشتری برای توضیح کل تنوع نیاز است (Hashizume *et al* 2003). آغازگرهایی که PIC و MI بالایی داشتند، برای جداسازی فاصله‌های ژنتیکی و برآورد چند شکلی مناسب‌تر از سایر عامل‌ها بودند. بنابراین ما آنها را برای مطالعات بیشتر در چغندر قند پیشنهاد می‌کنیم. آغازگرهای P7 و P13 کمترین PIC را داشتند و در مقایسه با سایر آغازگرها، مناسب برای بررسی نمونه‌ها نیستند. گروه‌های میتوآیپ حاضر، به دلیل مشاهده چند بانندی نشانگرهای TR1 و TR3، فقط نمونه‌های ایرانی را در بر می‌گیرد، می‌تواند دلالت بر ماهیت متفاوت ژرم‌پلاسم ایرانی داشته باشد. دلیل چندباندی مشخص نیست اما احتمال تکثیر باندهای غیراختصاصی ناشی از اتصال آغازگرها به نواحی دیگر DNA الگو می‌تواند منجر به مشاهده چندباندی گردد. این فرضیه با تکرار PCR با تغییر شرایط PCR و افزایش دمای اتصال تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد و سپس توالی‌یابی باندهای تولید شده، بررسی شد. بنابراین حضور باندهای غیراختصاصی ناشی از شرایط PCR پذیرفته نیست. در

زیر گونه‌های بتا ولگاریس برای توسعه ارقام با مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارای منابع ژنی با ارزشی هستند. شناسایی ژرم‌پلاسم مرحله مهمی برای کمک به برنامه‌های به‌نژادی است (Dos santos *et al.* 2011). شناسایی نمونه‌ها با قدرت تفکیک آغازگرهای ISSR انجام شد. تعداد ۱۳ آغازگر ISSR، ۱۴۷ باند با ۸۴/۲۷ درصد چندشکلی تولید نمودند. چندشکلی در گونه‌ها بسیار متغیر بود. چندشکلی مشابهی در گیاه آراییدوپسیس با ۹۵/۹۳ درصد (He *et al.* 2007) و در گیاه *Vernicia fordii* با ۸۱/۸۲ درصد (Li and Jin 2008) به‌دست آمد. مائوجیان و همکاران (MaoQian *et al* 2011) چندشکلی به میزان ۶۳/۸ درصد با استفاده از نشانگر SRAP در سه رقم چغندر قند چینی شناسایی کردند. مطابق سیواپراکاش و همکاران (Sivaprakash *et al.* 2004) توانایی آشکار کردن تنوع ژنتیکی شاید بیشتر به‌طور مستقیم وابسته به تعداد چندشکلی قابل تشخیص توسط سیستم نشانگر باشد. تجزیه ژنتیکی متعددی با موفقیت با نشانگرهای RAPD، AFLP و SSR انجام شده است (Smulders *et al.* 2010; Barzen *et al* 1995; Li *et al* 2010). اما تا این تاریخ تحقیقاتی در شناسایی ژرم‌پلاسم چغندر منتشر نشده است. ضریب همبستگی کوفنتیک (r) به میزان ۰/۹۶ بود که شباهت ژنتیکی متوسط و مناسبی بین نمونه‌های ماریتیمای مورد مطالعه را ارائه می‌دهد. از طرفی دیگر، کمترین شباهت بین نمونه‌های اروپایی و ایرانی مشاهده شد. در گروه اول حداکثر فاصله ژنتیکی بین m10 و m7 با ۳۴ درصد شباهت و حداقل فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های m5 و m6 با ۷۱ درصد شباهت بود. ارقام تجاری اروپایی در نواحی مختلف ایران کشت می‌شوند و امکان مهاجرت ماریتیمای اروپایی از طریق بذور تجاری محتمل است. تفکیک واضح ماریتیمای ایرانی از اروپایی منشاء ژنتیکی کاملاً متفاوت در این نمونه‌ها نشان داد. با وجود این تنوع ژنتیکی داخل

ماریتیمای را تقویت می‌کند و دلیل چندباندی حضور میتوکندری متفاوت است. اگر چه توارث میتوکندریایی ژنوم بتا تک والدی مادری گزارش شده است، اما احتمال دارد نمونه‌های ماریتیمای ایرانی چنین ویژگی منحصر به فردی ناشی از تفاوت ژنتیکی با نمونه‌های اروپایی داشته باشند. این اولین گزارش از جنس نمونه‌های زیرگونه ماریتیمای است. بنابراین مطالعات توارث سیتوپلاسمی بیشتری برای درک درست‌تر این موضوع در این نمونه‌ها پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر چغندر قند واقع در کرج، برای در اختیار گذاشتن نمونه‌های چغندر ماریتیمای سپاسگزار می‌باشند.

بررسی دلایل چند باندی، احتمالاً دلیل چند باند متفاوت مشاهده شده از یک آغازگر در نمونه می‌تواند ناشی از تهیه DNA توده‌ای از ۱۰ گیاه با محتوای سیتوپلاسمی متفاوت باشد. برای ارزیابی این فرضیه، PCR روی یک نمونه تک گیاه m1 با آغازگرها انجام شد و الگوی چند باندی مشاهده شد. نتایج ارزیابی تک بوته همان نتایج نمونه‌های توده‌ای را تایید کرد و چندباندی در نمونه‌های تک بوته مشاهده شد (شکل 4b). دلیل دیگر قابل توضیح برای مشاهده چندباندی می‌تواند وقوع نوترکیبی در ژنوم میتوکندریایی نمونه‌ها باشد. اگر چه توارث میتوکندریایی در بیشتر گیاهان تک والدی است اما در برخی موارد توارث دو والدی نظیر گیاه شمعدانی، توارث میتوکندریایی دو والدی مشاهده شده است (Daniell *et al.* 2004). توارث دو والدی منجر به این می‌شود که همه ژنوم میتوکندری‌های سیتوپلاسم یک نمونه هموزیگوت نباشند. مشاهده چند باندی در چغندر ماریتیمای احتمال توارث دو والدی در چغندر

منابع مورد استفاده:

References:

- Alem D, Narancio R, Dellavalle PD, Rebuffo M, Zarza R, Dalla Rizza M. Molecular characterization of *Lotus corniculatus* cultivars using transferable microsatellite markers. *Ciencia Investigacion Agraria.*, 2011; 38: 453-461.
- Arjmand MN, Farsinejad K, Alimoradi I, Aghaeizadeh M, Katal B. Pre-breeding for major disease resistances in sugar beet in Iran. *International beta genetic resources workshop and world beta network conference*; Izmir, Turkey; 1996.
- Arumuganathan K, Earle ED, Nuclear DNA content of some important plant species, *Plant Molecular Biology.* 1991; 1: 208-218.
- Barzen E, Mechelke W, Ritter E, Schulte-Kappert E, Salamini F. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci, *Theoretical and Applied Genetics.* 1995; 90: 189-193.
- Bhagyawant S, Srivastava N. Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships, *African Journal of Biotechnology.* 2008; 7: 4428-4431.
- Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M. Genetics and breeding of sugar beet, Science Publishers Inc, (Enfield NH) 2005; pp. 392.
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet, *Science.* 1997; 275: 832-834.

- Daniell H, Chase C. *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles: Chloroplasts and Mitochondria*, Springer, 2004; pp. 659.
- Desplanque B, Viard F, Bernard J, Forcioli D, Saumitou- Laprade P, Cuguen J, Dijk HV. The linkage disequilibrium between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies, *Molecular Ecology*. 2000; 9: 141-154.
- Dos Santos L, de Oliveira E, dos Santos Silva A, de Carvalho F, Costa J, Gomes Pádua J. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*, *Biochemistry Genetic*. 2011; 49: 540-554.
- Dumolin- Lapegue S, Pemonge MH, Petit RJ, Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks, *Molecular Biology and Evolution*. 1998; 15: 1321-1331.
- Fenart S, Arnaud JF, De Cauwer I, Cuguen J. Nuclear and cytoplasmic genetic diversity in weed beet and sugar beet accessions compared to wild relatives: new insights into the genetic relationships within the *Beta vulgaris* complex species, *Theoretical and Applied Genetics*. 2008; 116: 1063-1077.
- Fenart S, Touzet P, Arnaud JF, Cuguen J. Emergence of gynodioecy in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima* L.): a genealogical approach using chloroplastic nucleotide sequences, *Proceedings: Biological Sciences*. 2006; 273: 1391-1398.
- Ghislain M, Zhang D, Fajardo D, Huamán Z, Hijmans R. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers, *Genetic Resources and Crop Evolution*. 1999; 46: 547-555.
- Grimmer MK, Trybush S, Hanley S, Francis, SA, Karp A, Asher MJC. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus, *Theoretical and Applied Genetics*. 2007; 114: 1151-1160.
- Hashizume T, Shimamoto I, Hirai M, Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon *Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM & NAKAI] using RAPD, RFLP and ISSR markers, *Theoretical and Applied Genetics*. 2003; 106: 779-785.
- He F, Kang D, Ren Y, Qu L, Zhen Y, Gu H. Genetic diversity of the natural populations of *Arabidopsis thaliana* in China. *Heredity*. 2007; 99: 423-431.
- Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles*, 1908; 44: 223-270.
- Joshi-Saha A, Gopalakrishna T. Inheritance and tagging of gene regulating flowering time in the green manure crop *Sesbania rostrata* (Bremek. & Obrem.), *Molecular Breeding*. 2007; 20: 389-399.
- Kato K, Akashi Y, Tanaka K, Wako T, Masuda M. Genetic characterization of east and south Asian melon by the analysis of molecular polymorphisms and morphological characters. *Acta II, International Symposium In Melons*; 2003.

- Kozyrenko MM, Gontcharova SB, Gontcharov AA. Analysis of the genetic structure of *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) using inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms. *Flora*. 2011; 206: 691-696.
- Kumar LS. DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advances*, 1999; 17: 143-182.
- Li J, Schulz B, Stich B. Population structure and genetic diversity in elite sugar beet germplasm investigated with SSR markers. *Euphytica*. 2010; 175: 35-42.
- Li JM, Jin ZX. Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi* Oliv. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. *Genetica*. 2008; 133: 227-234.
- MaoQian W, ZeDong WU, HuaZhong W. Genetic diversity of major sugar beet varieties from three regions of china with SRAP markers. *Acta Agronomica Sinica*. 2011; 37: 811-819.
- Martins- Lopes P, Lima-Brito J, Gomes S, Meirinhos J, Santos L *et al.* RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2007; 54: 117-128.
- McCauley DE. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*. 1995; 10: 198-202.
- Meyer W, Michell TG, Freedman EZ, Vilgalys R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Biology and Biochemistry*. 1993; 31: 2274-2280.
- Nishizawa S, Kubo T, Mikami T. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets. *Current Genetics*. 2000; 37: 34-38.
- Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012; 28: 2537-2539.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 1996; 2: 225-238.
- Sankar AA, Moore GA. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001; 102: 206-214.
- Sehgal D, Rajpal V, Raina S, Sasanuma T, Sasakuma T. Assaying polymorphism at DNA level for genetic diversity diagnostics of the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) world germplasm resources. *Genetica*. 2009; 135: 457-470.
- Semagn K, Bjornstad A, Stedje B, Bekele E. Comparison of multivariate methods for the analysis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000; 101: 1145-1154.
- Sharma SK, Koneox MR, Ellis THN. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999; 93: 751-758.

- Sivaprakash K, Prashanth S, Mohanty B, Parida A. Genetic diversity of black gram (*Vigna mungo*) landraces as evaluated by amplified fragment length polymorphism markers. *Curr Sci*. 2004; 86: 1411-1416.
- Smulders MJ, Esselink GD, Everaert I, De Riek J, Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers. *BMC Genetics*. 2010; 11: 41.
- Sneath PH, Sokal RR. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification, (San Francisco, USA) Freeman Publisher Inc. 1973; pp. 573.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Reseach*. 1994; 22: 4673-4680.
- Venkateswarlu M, Urs SR, Nath BS, Shashidhar H, Maheswaran M, Veeraiah TM, Sabitha MG. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy. *Tree Genet & Genomes*. 2006; 3: 15-24.
- Verma S, Rana T. Genetic diversity within and among the wild populations of *Murraya koenigii* (L.) Spreng., as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2011; 39: 139-144.
- Vijayan K, Srivatsava P, Nair C, Awasthi A, Tikader A, Sreenivasa B, Urs SR. Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant breeding*. 2006; 125: 298-301.
- Wu K, Jones R, Dannaeburger L, Scolnik PK. Detection of microsatellite polymorphism without cloning. *Nucleic Acid Research*. 1994; 22: 3257-3258