

کاوش کتابخانه‌های شوری (EST) آلوروپوس لیتورالیس به منظور شناسایی نشانگرهای ریزماهواره

Exploring the EST libraries for developing microsatellite markers in *Aeluropus littoralis*

مریم میدانسری^۱، قربانعلی نعمت‌زاده^۱، احسان شکری^{۲*}

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

Meidansari M¹, Nematzadeh GH¹, Shokri E^{*2}

1. MSc Student, Professor, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

2. Assistant Professor, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT),
Sari, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: e.shokri62@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۹)

چکیده

ترادف‌های ثبت شده در پایگاه داده EST بانک ژن، منبع با ارزشی برای کشف ریزماهواره در مناطق عملکردی ژنوم می‌باشند. این توالی‌ها فرصت کشف ژن‌های جدید را داده، همچنین منبعی برای توسعه نشانگرها می‌باشند. برخلاف نشانگرهای ریزماهواره ژنومی (غیر کدکننده - gSSR)، نشانگرهای ریزماهواره EST (EST-SSR) به طرز موثری با صرف زمان و هزینه کمتر، از ترادف‌های رایگان کتابخانه‌های EST استخراج شده و کارایی خوبی دارند. در این تحقیق با استفاده از کتابخانه ترادف‌های EST در گراس شورزی آلوروپوس لیتورالیس و تجزیه بیوانفورماتیک، موتیف‌های ریزماهواره شناسایی شد و بر اساس آن ۱۶ نشانگر با چند شکلی مناسب (ALES)، برای بررسی‌های ژنومی معرفی شد. نتایج نشان داد که تعداد ریزماهواره در نواحی کدکننده در این گیاه زیاد (۶/۷ درصد) و مشابه با گیاه برنج (۴/۷ درصد) است. همچنین موتیف‌های tg، (gaa - gcg) و ttga بیشترین انواع موتیف ریزماهواره را در بانک اطلاعاتی EST گونه لیتورالیس تشکیل می‌دهند. شاخص میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای نشانگرهای مورد بررسی بین ۰/۲۷ و ۰/۳۷ با میانگین ۰/۳۲ محاسبه شد که بیشترین مقدار به نشانگرهای ALES (۱، ۳، ۱۱، ۱۳ و ۱۵) تعلق داشت. براین اساس میانگین ضریب فاصله (جاکارد) برای نمونه‌های مورد بررسی ۰/۵۵ به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های آلوروپوس را در شش گروه قرار داد. این نتایج نشان می‌دهد که درصد تنوع زیادی در نواحی کدکننده ژنوم گونه آلوروپوس لیتورالیس وجود دارد. از این اطلاعات می‌توان در آینده برای غنی‌سازی مخزن ژن‌های مقاوم به شوری و ارزیابی ژرم پلاسما استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

آلوروپوس لیتورالیس

بیوانفورماتیک

ریزماهواره

EST-SSR

مقدمه

امروزه مدیریت منابع ژنتیکی گیاهی از اهمیت بالایی از منظر زیست محیطی و تکنولوژی برخوردار است. تنوع گونه‌های گیاهی دربردارنده اطلاعات با ارزشی از تاریخ تکاملی، سیستم تولیدمثلی، توزیع جغرافیایی و اکولوژی محیط می‌باشد به طوری- که اثر این تغییرات تا حدی در ژنوم گونه‌ها قابل رؤیت و پیگیری است. تنوع ژنتیکی موتور محرک و مهمترین عامل پیش برنده انتخاب طبیعی و تکامل تدریجی است. مطالعه پیرامون تنوع ژنتیکی گونه‌ها منجر به اطلاع از سطح تنوع موجود در ژرم پلاسما، پیشرفت برنامه‌های بهنجاری و استفاده بهینه از خزانه‌های ژنی می- شود. علاوه براین می‌تواند راه کارهای محافظتی با ارزشی را برای گونه‌های در معرض خطر فراهم کند (Yang et al. 2013). مطالعه تنوع ژنتیکی با ابزارها و امکانات خاص خود انجام می‌شود و بر اساس اصول آماری و محاسباتی بیان می‌شود. نشانگرها یا صفات گونه‌ها، عمده‌ترین وسیله مطالعه می‌باشند. در واقع هر نوع ویژگی مشترکی که در افراد جمعیت سطح تفاوت قابل قبولی داشته باشد، می‌تواند به عنوان معیار سنجش تنوع باشد (Guarino et al. 1995). امروزه مشخص شده که مولکول DNA، از پتانسیل بالایی برای نمایش تفاوت‌ها حتی در گونه‌های بسیار نزدیک برخوردار است، امری که منجر به توسعه سریع نشانگرهای مبتنی بر DNA شده‌است (Troyer et al. 1998).

نشانگرهای ریزماهواره (SSR) به دلیل حجم بالای اطلاعات، توارث هم‌بازر، تکرارپذیری، اختصاصی بودن و برخورداری از کیفیت و کمیت لازم به عنوان یکی از مفیدترین ابزارهای مولکولی در حوزه ژنومیکس مطرح هستند (Ya-ming et al. 2013; Jugran et al. 2013; Chai et al. 2011). موتیف‌های تکراری SSR می‌تواند در ناحیه کدشونده (مانند توالی‌های EST) یا غیر کدشونده ژنوم یوکاریوت‌ها یافت شود. برخلاف توسعه زمان‌بر و هزینه‌بری که برای نشانگرهای ژنومی (غیرکدکننده) وجود دارد، نشانگرهای EST-SSR به‌طور موثری با توالی‌های EST رایگان در کتابخانه cDNA توسعه یافته و تنوع خوبی را میان گونه‌های مختلف دارند. رکوردهای EST توالی‌های کوتاه قرائت شده از کتابخانه cDNA هستند که یک نمایش لحظه‌ای از ژن‌های بیان شونده در بافت‌ها و یا مرحله نموی خاص را نشان

می‌دهند. اطلاعات ESTها به طور گسترده‌ای برای کشف ژن، مطالعات ژنومیکس عملکردی و توسعه نشانگرها به کار می‌روند (Joshi et al. 2011; Jiang et al. 2012; Bendhifi et al. 2013; Yang et al. 2013). اخیراً با افزایش سریع توالی‌های EST در پایگاه‌های اطلاعاتی، استخراج SSR از EST آسان‌تر شده و تا به امروز نشانگرهای EST-SSR به طور موفقیت‌آمیزی توسعه یافته و در گونه‌های گیاهی زیادی از جمله برنج، گندم، جو، سویا، پنبه، سیب زمینی شیرین، مرکبات و غیره به کار برده شده‌اند.

با استفاده از تجزیه‌های بیوانفورماتیکی، می‌توان EST-SSRها را جستجو و شناسایی کرد. مطالعات نشان دادند که نشانگرهای EST-SSR می‌توانند به‌طور موفقیت‌آمیزی بین گونه‌های نزدیک به هم یا بین جنس‌های مختلف انتقال‌پذیر باشند، در نتیجه آنالیزهای ژنومیکس مقایسه‌ای آسان‌تر می‌شوند (Sorrells et al. 2012; Barati et al. 2011; Li et al. 1997). تحقیقات فراوانی موتیف‌های ریزماهواره را در رکوردهای ثبت شده EST در برخی از گونه‌های گرامینه شامل گندم، جو، ذرت، برنج و سورگوم مورد بررسی قرار دادند (Li et al. 2008). بیش از ده هزار توالی تکراری کوتاه (SSR) در مجموع ۴۰۷۶۶۳ رکورد EST مورد مطالعه مشاهده شد. براین اساس ۱۳۶۷ جفت آغازگر طراحی شد و پس از بررسی ژنومی مشخص شد، که آغازگرهای طراحی شده در ۷۱۵ مورد از کیفیت بالای تکثیر و انتقال‌پذیری مناسب بین گونه‌ای برخوردار هستند. در این تحقیق موتیف‌های سه نوکلئوتیدی در گندم با ۴۷/۴۳ درصد، ذرت ۴۲/۷۸ درصد، برنج ۵۵/۴ درصد، سورگوم ۴۱/۲۳ درصد و موتیف‌های چهار نوکلئوتیدی با ۲۸/۰۶ درصد در جو بیشترین فراوانی را در مجموعه موتیف‌ها ریزماهواره داشت. نشانگرهای EST-SSR توانایی آسان کردن تجزیه‌های تکاملی را در گونه‌های مختلف داشته و می‌توانند به خوبی، راه‌های پیشرفت را برای گونه‌هایی که منابع اندکی از آنها در دسترس است، نشان دهند. همچنین نشانگرهای EST-SSR به علت هم‌بازری، تکرارپذیری بالا و الگوی تکثیر شفاف، می‌توانند ابزار مفیدی برای آنالیز سطح تنوع ژنتیکی بخش‌های عملکردی ژنوم باشند (Li-Bin et al. 2008). استفاده از ۵۰ جفت آغازگر طراحی شده از نواحی ریزماهواره موجود در رکوردهای EST گیاه کنجد، ژنوتیپ‌های کنجد را در

ابتدا تمام مجموعه ترادف‌های EST گزارش شده (تاریخ دانلود سپتامبر ۲۰۱۱) برای جنس آلوروپوس در گونه لیتورالیس از بانک ژن NCBI، (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) دریافت شد و در قالب فایل text ذخیره سازی شد. به منظور حذف تکرارهای زائد، توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار (Lasergene DNASTar Evolution Suite) دسته‌بندی شدند و موتیف‌های SSR توسط نرم‌افزار SSRIT (<http://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool>) در هر توالی شناسایی شد. سپس توالی‌هایی که شامل حداقل پنج تکرار ۲، ۳، ۴ و ۵ نوکلئوتیدی بودند، انتخاب شدند. در گام بعدی ترادف‌هایی که واجد شرایط طراحی آغازگر بودند به نرم افزار ۳ PRIMER معرفی شدند. در این طراحی، درصد GC بین ۴۵ تا ۶۰، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی-گراد و طول آغازگرها ۱۸ تا ۲۷ باز در نظر گرفته شد (جدول ۲). ارزیابی‌های مولکولی

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، DNA ژنومی از برگ اکوتیپ‌ها به روش (Dellaporta et al. 1983) استخراج شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. از نسبت OD در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (۲۶۰/۲۸۰) در تعیین درجه خلوص DNA استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD, USA) و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۹۲ درجه سانتی-گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۴-۵۲ درجه سانتی‌گراد (بسته به دمای ذوب آغازگر) به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در انتها یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات تکثیر با استفاده از ژل آگارز سه درصد تفکیک و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. محصولاتی که الگوی باندهای شفاف را روی ژل آگارز ارائه ندادند با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته‌ساز ۶ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل-ها با استفاده از روش نترات نقره صورت گرفت.

چهار گروه اصلی جای دادند. میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرهای مورد مطالعه از ۰/۱ تا ۰/۸۴ متغیر بود. آغازگرهای EST-SSR توسعه یافته برای کنجد، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی لینکاژی و مطالعات انتقال‌پذیری در گیاهان روغنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. (Ma et al. 2012) نشان دادند نشانگرهای EST-SSR بدست آمده از کتابخانه گیاه جای از کارایی مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح مولکولی در جای برخوردار هستند. هدف از این تحقیق در اولین گام، استخراج و طراحی مجموعه‌ای از نشانگرهای EST-SSR با استفاده از کتابخانه‌های داده‌های EST در گراس شورزی آلوروپوس لیتورالیس می‌باشد. سپس شاخص‌های نشانگری و کارآمدی روش EST-SSR در مطالعات چندشکلی و تنوع ژنتیکی در یک مجموعه از اکوتیپ‌های آلوروپوس لیتورالیس که از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده، ارزیابی شد. آلوروپوس تک‌لپه‌ای از خانواده گرامینه بوده که چهار گونه آن به نام‌های *Aeluropus Aeluropus Macrostachyus Aeluropus lagopoides littoralis* و *Aeluropus Pilosus* در ایران شناسایی شدند. این گیاه به دلیل تحمل به شوری بالا، می‌تواند در امر بهره‌برداری از اراضی و آب-های شور به عنوان یک گیاه مرتعی و علوفه‌ای جنبه‌های کاربردی زیادی داشته باشد (Barhoumia et al. 2007; Zouari et al. 2007). بدیهی است آگاهی کامل‌تر از ژنتیک این گیاه و سازمان ژنومی آن به عنوان یک مدل هالوفیتی، با مطالعه ساختار و دینامیک جمعیت آن میسر خواهد بود و در این مطالعات استفاده از نشانگرهای مولکولی غیرقابل اجتناب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد نیاز در این تحقیق شامل بر ۲۰ اکوتیپ مختلف گونه *A. littoralis* می‌باشد که در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ از عرض‌های جغرافیایی مختلف ایران جمع‌آوری شدند (جدول ۱) و بذر یا قلمه آن در گلخانه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تکثیر شد. شناسایی نواحی ریزماهواره و طراحی آغازگر

جدول ۱- محل جمع آوری اکوتیپ‌های مورد استفاده

محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دريا (m)	علامت اختصاری اکوتیپ
اصفهان رود دشت	۵۹	۳۲	۱۳۶۲	A
اتوبان قم-تهران	۵۱	۳۵	۹۵۸	B
اتوبان قم-تهران	۵۰	۳۵	۹۵۸	C
اتوبان قم-تهران، بعد از بهشت معصومه	۵۰	۳۴	۸۷۸	D
آذربایجان شرقی، بندر شرفخانه نزدیک ساحل	۴۵	۳۸	۱۲۹۰	E
جاده قدیمی کاشان -قم، مشکان ۱۰۰۰ متر درون کویر	۵۱	۳۴	۸۵۱	F
جاده کرج-اشتهارد، روستای جعفر آباد	۵۰	۳۵	۱۱۵۶	G
جاده قوشچی-ارومیه شرکت ایران نشاط	۴۵	۳۷	۱۳۰۰	H
شهر وایقان شبستر	۴۵	۳۸	۱۲۹۹	I
اتوبان قم-تهران	۵۰	۳۵	۱۱۵۳	J
جاده صوفیان-شبستر، روستای علیشاه	۴۵	۳۸	۱۳۰۶	K
جاده نهبندان به بیرجند، بعد از پلیس راه خوسف، دریاچه فیروز آباد	۵۹	۳۲	۱۳۶۲	L
جاده زاهدان به زابل، منطقه ارمک، ۵۰ کیلومتر مانده به زاهدان	۶۰	۲۹	۸۲۴	M
اتوبان قم-تهران، بعد از بهشت معصومه	۵۰	۳۴	۸۷۷	N
کاشان، ابوزید، ۲۰ کیلومتری جاده حاکی درون کویر، رود خشک قندی آباد	۵۱	۳۴	۱۰۱۴	O
سراب منطقه قشلاق حدود ۱۰ کیلومتری سراب	۴۷	۳۷	۱۶۵۸	P
جاده سراب به ایرانشهر، روستای رسول آباد	۶۰	۲۷	۵۵۸	Q
جاده بندر عباس-فورک	۵۵	۲۸	۶۷۶	R
جاده سروستان به فسا، پلاک ۴۰ قلات معروف به چشمه شور	۵۳	۲۹	۱۵۸۹	S
جاده قائن به خاف، ۱۰ کیلومتری مهدی آباد داخل رودخانه شور	۵۹	۳۳	۱۱۲۲	T

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوهای نواری به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی شدند. برای هر جایگاه پارامترهای میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و تنوع ژنی (D) از رابطه‌های زیر برآورد شدند (Botstein et al. 1980).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

$$D = 1 - \sum p_i^2$$

در این رابطه‌ها P_j و P_i به ترتیب فراوانی آلل‌های i و j در یک جایگاه ریزماهواره می‌باشد. سپس ضرایب تشابه مختلف (جاکارد، دایس و تطابق ساده) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc ۲/۰ محاسبه شد و با استفاده از الگوریتم‌های مختلف ترسیم دندروگرام (اتصال ساده، اتصال کامل و اتصال متوسط) و مقایسه ضرایب کوفتیک بهترین الگوریتم خوشه‌بندی و ضریب مشابهت

نتایج و بحث

ترادف‌های ثبت شده در پایگاه داده EST بانک ژن منبع مهمی برای کشف ریزماهواره در نواحی عملکردی ژنوم می‌باشد. این توالی‌ها فرصت کشف ژن‌های جدید را فراهم کرده و همچنین منبعی برای توسعه نشانگرها می‌باشند. از مجموع ۴۷۲ رکورد EST به دست آمده متعلق به جنس آلورپوس، تعداد ۳۲ مورد (۶/۷ درصد) حاوی نواحی ریزماهواره بودند که از این تعداد در

جدول ۲- مشخصات جایگاه‌های مورد استفاده در این مطالعه

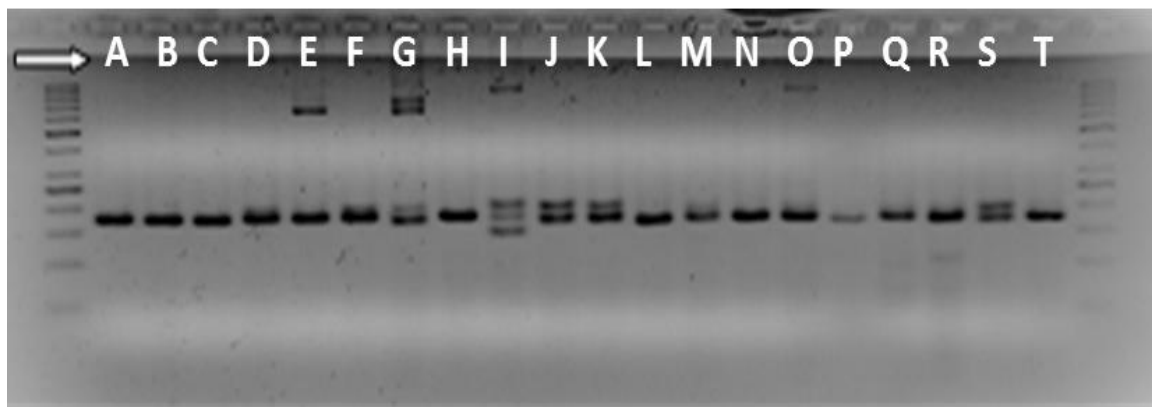
جایگاه	نوع موتیف	آغازگر رفت (۳' - ۵')	آغازگر برگشت (۳' - ۵')
ALES1	(GAA)9	TGACAAGGCATCAGCTTAAGAA	TAAAGGAAACGATCAGCACGTA
ALES2	(CG)6	AGAGGGAGGGATATAGCGAAAC	ACTAGTAGCAAGCGCAAACACA
ALES3	(GT)5	ACAAGTAGTAGGCGGGTTCGTA	GTCCATGGTTTACAACAACACG
ALES4	(TG)5	TTGGTCGAATGATGTCTTTGTC	CAGATCACGGTTCACCTTATCCA
ALES5	(TG)7	AGGTAGAATAACGGGCAATTCA	TGCAGTAGACAAGAGCAACACA
ALES6	(CAG)11	GGTGTGTTTCGATGATGTGAACT	CCACTGATGTCACCTCATCTGGT
ALES7	(GCG)5	AGGCTCAAGCAATCATGCTTAT	CTTTGCTTACAATCCTGTCACG
ALES8	(AT)5(AC)6	AGGAGGTGATTCGTCCAAAATA	TGACATACATAAGACCCCGACA
ALES9	(ACA)7	AAGAGACTTCTTGCATTTGTGG	CCAACCTGCTTGGGATAAAAAG
ALES10	(CG)6	AGAGGGAGGGATATAGCGAAAC	TTCTAGTAGCAAGCGCAAACAC
ALES11	(TC)5	GCAAGACAGAACCCCAATAAAG	CCGAAAAATCCCTAAGACACAG
ALES12	(GAA)9	CTATCTGTAAAGCGCATTGCTG	AGTTCGCCAGACTCAAAAAGAG
ALES13	(TTGA)5	CTTCTTCCCTCTTCCTCTTCG	GATTTTCAGAGCTGATCCAACCT
ALES14	(atgc)5	CGATGAAATGTGATGTGATGTG	AACCAGCAAGGTCATGAAGATT
ALES15	(GCA)10	TTCACCTCCCTTCGGCTGAT	AAATGCTACACATTGCTCCTCT
ALES16	(GCG)7	TCCTCGCATCACCTATAAATC	CTCTTGGAACCTTCTCCTCCTC
ALES17	(AC)6	CATACGAAGAATGAATGGGACA	TGGAGAAGAGAGGCATCTTAGG
ALES18	(CAA)5	ATTTTGGAATGGGAGGAGGT	ATTTACTGCGCGTGTGTGAG

جدول ۳- فراوانی موتیف‌های تکراری در نشانگرهای EST-SSR

نوع تکرار	ساختار تکرار	میانگین طول ناحیه تکراری	درصد فراوانی
دونوکلئوتیدی	TG,TC,AT,CT,CG,GT,TA,AC	۷/۲	۵۶/۲۵
سه نوکلئوتیدی	GAA,CTA,ACC,CAG,GCG,CAA,ACA,GCA	۷/۱	۳۴/۳۷
چهار نوکلئوتیدی	TTGA,ATGC	۵	۹/۳۷

تعداد و نوع تکرارهای ریزماهوره قرار گرفته به ویژه در نواحی 5'UTR و 3'UTR و اینترون‌ها می‌توانند بیان ژن را کنترل کنند. همچنین بررسی تنوع تکراری در گیاه آلوروپوس نشان داد که از لحاظ نوع تکرار، تکرارهای دو نوکلئوتیدی (۵۶ درصد) و سه نوکلئوتیدی (۳۴ درصد) فراوانی بیشتری در بانک اطلاعاتی EST دارند. همچنین تکرارهای چهار نوکلئوتیدی در ۱۰ درصد از ترادف‌های EST مورد مطالعه یافت شدند. در بسیاری از گیاهان تکرارهای دو و سه حرفی بیشترین نوع تکرار بوده‌اند، البته فراوان‌ترین نوع تکرار در گیاهان مختلف متنوع است و به عوامل مختلفی مانند معیارها و ابزارهای جستجو، اندازه پایگاه داده و ساختار یا ترکیب ژنومی بستگی دارد. در غلات مانند برنج، گندم،

۱۸ مورد طول و شرایط نواحی مجاور تکرارهای ریزماهوره، برای طراحی آغازگر مناسب تشخیص داده شد. این مجموعه از آغازگرها به صورت نشانگرهای ALES (*Aeluropus littoralis*) (EST-SSR) نامگذاری شد. (Kantety et al. 2002) نشان دادند که فراوانی ریزماهوره به طور میانگین در غلات ۳/۲ درصد می‌باشد به طوری که ذرت با ۱/۵ درصد و برنج با ۴/۷ درصد به ترتیب کمترین و بیشترین فراوانی ریزماهوره را در رکوردهای EST خود داشتند. با بررسی رکوردهای محدود EST در گیاه آلوروپوس، به نظر می‌رسد در این گیاه (۶/۷ درصد) همانند برنج (۴/۷ درصد) درصد بالایی از ریزماهوره در نواحی کد کننده وجود دارد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که برخی نواحی ریزماهوره در تنظیم بیان ژن و پیرایش RNA دخالت دارند و



شکل ۱- الگوی تکثیر حاصل از نشانگر ALES14 در اکوتیپ‌های آلوروپوس لیتورالیس. چاهک اول در سمت چپ ژل نشانگر وزن مولکولی (Fermentas 50 bp ladder).

انجام داد. همچنین مشخص شده که فراوانی نسبی تکرارها بسته به طول ناحیه تکراری در گیاهان گرامینه متفاوت است و اگر از فراوانی یک تکرار صحبت می‌شود بایستی اندازه آن (طول کل منطقه تکرار شده) ذکر شود (Barker et al. 2000; Kantety et al. 2002). با این وجود بیشترین ساختارهای تکراری سه واحدی در آلوروپوس لیتورالیس تکرارهای غنی از GC بودند (جدول ۳)، که با محتوی بالای GC در نواحی کد کننده ژنوم تطابق دارد (Honghui et al. 2000; Roman et al, 2012). همچنین مشاهده شد اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین طول ناحیه تکراری بین تکرارهای دو و سه نوکلئوتیدی وجود ندارد و تکرارهای چهار نوکلئوتیدی کمتر از دو نوع قبلی امتداد می‌یابند (جدول ۳).

از مجموع ۱۸ جفت آغازگر EST-SSR (نشانگرهای ALES) بررسی شده، ۱۶ آغازگر الگوی آلی قابل امتیازدهی ایجاد کردند. عدم تکثیر در ALES ۷ و ALES ۱۷ احتمالاً ناشی از تغییر توالی-های هدف به سبب موتاسیون‌های نقطه‌ای، حذف یا معکوس شدن و یا تغییر توالی‌های حاشیه‌ای جایگاه‌های ریزماهواره می‌باشد. الگوی تکثیر نشانگر ALES ۱۴ برای اکوتیپ‌های آلوروپوس لیتورالیس در شکل ۱ نشان داده شده‌است. در مجموع ۵۷ مکان ژنی با ۸۹ درصد چند شکلی و میانگین ۳/۶ آلل به ازای هر جفت آغازگر با استفاده از ۱۶ نشانگر ALES تکثیر شد. بیشترین تعداد مکان ژنی تکثیر شده قابل امتیازدهی مربوط به ALES ۲ و ALES ۹ با هفت جایگاه و کمترین آن مربوط به ALES ۴، ۶ و ۱۶ هر کدام با یک جایگاه بود. همچنین

جو و در سویا تکرار سه نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی را دارد و احتمال وقوع تکرار چهار نوکلئوتیدی در گندم و برنج و تکرار دو نوکلئوتیدی در جو، ذرت و سورگوم کمتر از بقیه انواع بوده است (Gao et al. 2003; Thiel et al. 2003; Chen et al. 2005; Linzhi et al. 2008; Yu-lin et al. 2010; Zeid. 2010; Ram et al. 2013).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تکرارهای *tg*، *gaa-gcg* و *ttga* بیشترین نوع ساختاری ریزماهواره دو، سه و چهار نوکلئوتیدی را در مجموعه رکوردهای EST گونه لیتورالیس تشکیل می‌دهند. (Kantety et al. 2002) تکرار دوتایی (GA و CT) و تکرار سه واحدی (GGC و CCG) را فراوان‌ترین نوع تکرار در مخزن EST غلات (جو، ذرت، برنج، سورگوم و گندم) معرفی کردند. در این تحقیق امکان مقایسه دقیق فراوانی نوع موتیف‌های تکرار شونده در گیاه آلوروپوس لیتورالیس با سایر گیاهان گرامینه و انجام نتیجه‌گیری مقدور نیست زیرا برای یک نتیجه صحیح بایستی تعداد بسیار بیشتری رکورد EST در دسترس باشد که چنین امکانی فعلاً برای این گیاه وجود ندارد. علاوه بر این نوع کتابخانه EST استفاده شده برای کشف و دریافت نواحی ریزماهواره نیز در نتیجه نهایی موثر است. نواحی ریزماهواره‌ای شناسایی شده در این تحقیق برای گیاه آلوروپوس تماماً از ترادف ژن‌های پاسخگو به تنش شوری استخراج شده‌است، لذا عدم انطباق فراوانترین انواع تکرار با آنچه در مورد مخزن غلات تاکنون گزارش شده امر دور از انتظاری نیست. بدیهی است با توسعه بانک داده EST در این گیاه و تجزیه جامع‌تر ترانسکرپتوم می‌توان مقایسه دقیق‌تری

جدول ۴- اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی آغازگرها

کل جایگاه‌ها	جایگاه‌های چند شکل	ارزش PIC	ارزش D	جایگاه
۳	۲	۰/۳۷	۰/۴۹	ALES1
۷	۷	۰/۲۸	۰/۳۴	ALES2
۲	۲	۰/۳۷	۰/۵	ALES3
۲	۱	۰/۲۷	۰/۳۲	ALES4
۳	۲	۰/۲۸	۰/۳۴	ALES5
۱	۱	۰/۲۷	۰/۳۲	ALES6
۶	۶	۰/۳۳	۰/۴۱	ALES7
۴	۴	۰/۳۳	۰/۳۷	ALES8
۷	۷	۰/۲۹	۰/۳۴	ALES9
۴	۳	۰/۳۵	۰/۴۶	ALES10
۳	۳	۰/۳۷	۰/۵	ALES11
۵	۵	۰/۳۲	۰/۴	ALES12
۳	۲	۰/۳۷	۰/۴۹	ALES13
۴	۴	۰/۳۶	۰/۴۸	ALES14
۳	۳	۰/۳۷	۰/۵	ALES15
۱	۱	۰/۲۷	۰/۳۲	ALES16

تعداد آل‌های تکثیر شده توسط هر نشانگر در دامنه‌ای از یک تا هفت عدد و دامنه طول باندهای تکثیر شده نیز از ۱۰۰ جفت باز تا ۱۰۰۰ جفت باز متغیر بود. شاخص میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای نشانگرهای مورد بررسی بین ۰/۲۷ و ۰/۳۷ با میانگین ۰/۳۲ محاسبه شد که از این لحاظ، نشانگرهای ۱۳، ۱۱، ۳، ۱، ALES با کسب ماکزیمم میزان چند شکلی (۰/۳۷)، قدرت تمایز بالاتری برای این گروه از اکوتیپ‌ها نشان دادند (جدول ۴).

سطح پلی‌مورفیسم نشانگرهای EST-SSR می‌تواند به تعداد و طول واحدهای تکراری و موقعیت ریزماهواره درون توالی‌های بیان شونده نسبت داده شود (Barker et al: 2000; Kantety et al. 2002). نشانگرهای ۱۶، ۶ و ۴ ALES با ۰/۲۷ کمترین میزان شاخص PIC را نشان دادند. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها و اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی می‌باشد (Sanjay et al. 2000). مطالعه حاضر نشان می‌دهد شاخص چند شکلی متوسطی در بین نشانگرهای ALES وجود دارد که البته با توجه به حفاظت‌شدگی بالای نواحی بیان شونده این مقدار از شاخص چند شکلی قابل توجه است و نشان دهنده کارآمدی نشانگرهای مورد مطالعه برای

نقشه یابی ژنی، اصلاح مولکولی و ارزیابی ژرم پلاسما می‌باشد. از نظر شاخص تنوع ژنی (H) نشانگرهای ۱ ALES و ۱۳ ALES بیشترین (H= ۰/۴۹) و ۴ ALES، ۶ ALES و ۱۶ ALES کمترین (H= ۰/۳۲) مقدار را نشان دادند.

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب فاصله جاکارد ژنوتیپ‌های آلوروپوس را به شش گروه منتسب کرد. بر این اساس نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرکز (استان های تهران، قم و اصفهان) در دو گروه (دوم و چهارم) همراه با نمونه‌های شمال غرب و جنوب- شرق کشور هم‌گروه شدند. به نظر می‌رسد وجود اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مرکزی در اکثر گروه‌ها و همچنین سطح بالای تفاوت ژنتیکی در این اکوتیپ‌ها نشان‌دهنده جریان ژنی باشد (Ahmed et al. 2011). همچنین بر اساس تجزیه کلاستر مولکولی بیشترین اختلاف با کل نمونه‌های مورد بررسی را اکوتیپ Q که از منطقه سرباز استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شده بود، نشان داد (شکل ۲)، امری که احتمال انتقال فیزیکی از کشور همسایه یا احتمال وجود گیاهان بین گونه‌ای را در جنس آلوروپوس مطرح می‌سازد (Ahmed et al. 2011; Seongho et al. 2011; Masakazu et al. 2013). تجزیه

مختلف آلوروپوس لگوپوئیدس مشاهده کردند. همچنین نتایج مشابهی توسط Lambertini et al. (2008) در گیاه علفی و چند ساله *Phragmetis australias* که جز شورزی‌های گرامینه محسوب شده، گزارش شده است. بدیهی است که مطابق انتظار و به علت سطح بیشتر حفاظت‌شدگی نواحی کدکننده نسبت به مناطق ژنومی غیر کدکننده، در این مطالعه میزان تنوع کمتری مشاهده شد. نهایتاً، در این مطالعه برای اولین بار شانزده نشانگر اختصاصی EST-SSR (ALES) در گیاه آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از بیوانفورماتیک و کاوش کتابخانه EST معرفی شد. نشانگرهای به دست آمده توانستند به خوبی چندشکلی موجود در نواحی کدکننده در یک مجموعه از اکوتیپ‌های آلوروپوس لیتورالیس (۲۰ نمونه) را آشکار کنند و برای تخمین تنوع، فاصله ژنتیکی و گروه‌بندی اکوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، هزینه‌های نسبتاً پایین توسعه این نشانگرها در مقایسه با ریزماهورهای بدست آمده از کتابخانه‌های ژنومی، قابل توجه است. این نشانگرها می‌توانند برای شناخت ژرم پلاس آلوروپوس مفید واقع شوند و بررسی تنوع اکوتیپ‌ها، پروژه‌های نقشه‌یابی و انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی را سرعت ببخشند.

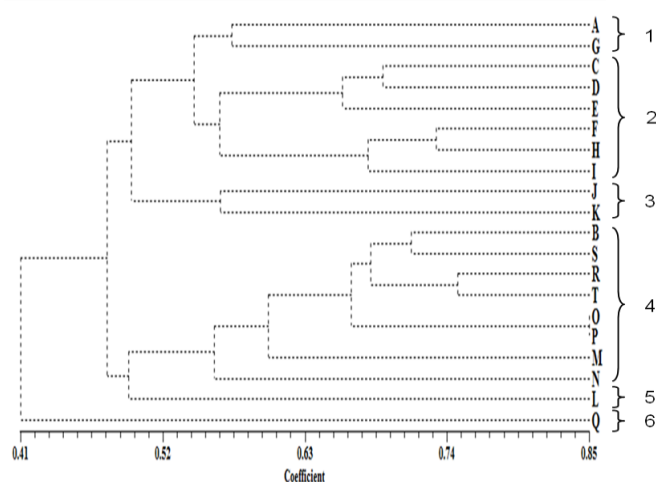
سپاسگزاری

این تحقیق با پشتیبانی علمی و مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان انجام شد.

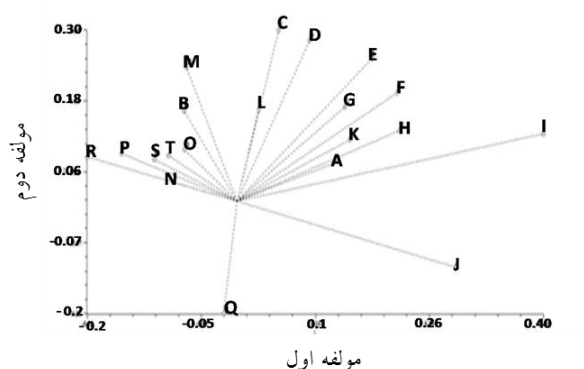
منابع

- Ahmed MZ, Gilani SA, Kikuchi A, Gulzar S, Khan MA, Watanabe KN (2011) Population diversity of *Aeluropus lagopoides* a potential cash crop for saline land. *Pakistan Journal of Botany* 43:595-605.
- Barati M, Arzani A (2012) Genetic diversity revealed by EST-SSR markers in cultivated and wild safflower. *Flora Biochemical Systematics and Ecology* 44:117-123 (In Farsi).
- Barhoumia Z, Djebalib W, Smaouic A, Chaïbi W, Abdelly C (2007) Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus littoralis* (Willd) Parl. *Plant Physiology* 164:842-850.
- Barker GC (2002) Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:21-24.
- Bendhifi M, Baraket B, Zourgui L, Souid S, Salhi-Hannachi A (2013) Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus indica*) cultivars by

به مختصات اصلی نیز نشان داد که با استفاده از مؤلفه‌های اول و دوم (شکل ۳) و سوم در مجموع ۱۲ درصد از تغییرات توجیه می‌شود و پراکندگی زیادی در اکوتیپ‌ها وجود دارد. در الگوی گروه‌بندی تجزیه PCA نیز همانند دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مشاهده می‌شود که اکوتیپ‌های بدست آمده از مناطق مرکزی در نقاط مختلف نمودار مختصات پراکنده هستند. بنابراین تجزیه به مختصات اصلی نیز سطح بالای تنوع ژنتیکی نمونه‌های بدست آمده از مرکز و پراکندگی در گروه‌های مختلف مطابق آنچه در روش تجزیه خوشه‌ای مشاهده شد را تأیید می‌کند (شکل ۳).



شکل ۲- دندروگرام داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی EST-SSR با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPMGA). علامت اختصاری در جدول ۱ توضیح داده شده است.



شکل ۳- نمودار دو بعدی اکوتیپ‌های آلوروپوس لیتورالیس بر اساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم که در مجموع ۱۰ درصد تغییرات را توجیه می‌کند. میانگین ضریب تشابه برای نمونه‌های مورد بررسی ۰/۵۵ بدست آمد. این نتیجه نشان می‌دهد که درصد تنوع زیادی (۴۵ درصد) در نواحی کدکننده وجود دارد. (Ahmed et al. (2011) با استفاده از نشانگر RAPD بیش از ۵۰ درصد تنوع داخل جمعیت‌های

- RAPD markers and morphological traits. *Scientia Horticulturae* 158:1-7.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Chai L, Biswas MK, Yi H, Guo W, Deng X (2013) Transferability, polymorphism and effectiveness for genetic mapping of the Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) EST-SSR markers. *Scientia Horticulturae* 155:85-91.
- Chen HM, Li LZ, Wei XY (2005) Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat. *Chinese Science Bulletin* 50:2328-2336.
- Dellaporta SL, Wood J, Tickes J (1983) A plant molecular DNA miniprep preparation version II. 1:19-21.
- Dhandapani V, Choi SR, Paul P, Kim YK, Ramchiary N, Hur Y, Lim YP (2012) Development of EST database and transcriptome analysis in the leaves of *Brassica rapa* using a newly developed pipeline. *Genes and Genomics* 34:671-679.
- Gao LF, Tang JF, Li HW (2003) Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Molecular Breeding* 12:245-61.
- Gordon D (2003) Viewing and editing assembled sequences using Consed, *Current Protocols in Bioinformatics* Chapter 11, Unit11.2
- Guarino L, Ramanatha V, Rao and Reid. 1995. Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines. Published by CABI. chapter 7.
- <http://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool>.
- Iwaizumi MG, Tsuda Y, Ohtani M, Tsumura Y, Takahashi M (2013) Recent distribution changes affect geographic clines in genetic diversity and structure of *Pinus densiflora* natural populations in Japan. *Forest Ecology and Management* 304:407-416.
- Jaksik R, Rzeszowska-Wolny J (2012) The distribution of GC nucleotides and regulatory sequence motifs in genes and their adjacent sequences. *Gene* 492:375-381.
- Jiang L, Wanga L, Liu L, Zhu X, Zhai L, Gong Y (2012) Development and characterization of cDNA library based novel EST-SSR marker in radish (*Raphanus sativus* L.). *Scientia Horticulturae* 140:164-172.
- Joshi RK, Kar B, Nayak S (2011) Exploiting EST databases for the mining and characterization of short sequence repeat (SSR) markers in *Catharanthus roseus* L. *Bioinformatics* 5:378-381.
- Jugran AK, Bhatt ID, Rawal RS, Nandia SK, Pande V (2013) Atterns of morphological and genetic diversity of *Valeriana jatamansi* Jones in different habitats and altitudinal range of West Himalaya, India. *Flora* 208:13-21.
- Kantety RV, Rota ML, Matthews DE (2002) Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 48:501-510.
- Kresovich S, Szew-McFadden AK, Bliet SM, McFerson JR (1995) Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theoretical and Applied Genetics* 91:206-211.
- Lambertini C, Gustafsson M, Frydenberg J, Speranza M, Brix H (2008) Genetic diversity patterns in *Phragmites australis* at the population, regional and continental scales. *Aquatic Botany* 88:160-170.
- Li G, Ra WH, Park JW, Kwon SW, Lee JH, Park CB, Park Y (2011) Developing EST-SSR markers to study molecular diversity in *Liriopeand Ophiopogon*. *Biochemical Systematics and Ecology* 39:241-252.
- Li L, Wang J, Guo Y, Jiang F, Xu Y, Wang Y, Pan H, Han G, Li R, Li S (2008) Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat. *Progress in Natural Science* 18:485-1490.
- Li L, Wang J, Guo Y, Jiang F, Xu Y, Wang Y, Pan H, Han G, Li R, Li S (2008) Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat. *Progress in Natural Science* 18:1485-1490.
- Li-Bin W, Hai-Yang Z, Yong-Zhan Z, Wang-Zhen G, Tian-Zhen Z (2008) Developing EST-Derived Microsatellites in Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta Agronomica Sinica* 34:2077-2084.
- Liu YL, Li YH, Zhou GA, Uzokwe N, Chang RZ, Chen SY, Qiu LJ (2010) Development of Soybean EST-SSR Markers and Their Use to Assess Genetic Diversity in the Subgenus Soja. *Agricultural Sciences in China* 9:1423-1429.
- Ma JQ, Ma CL, Yao MZ, Jin JQ, Wang ZL, Wang XC, Chen L (2012) Microsatellite markers from tea plant expressed sequence tags (ESTs) and their applicability for cross-species/genera amplification and genetic mapping. *Scientia Horticulturae* 134:167-175.
- Richterich P (1998) Estimation of errors in "raw" DNA sequences: a validation study. *Genome Research* 8:251-259.
- Shete S, Tiwari H, Elston RC (2000) On Estimating the Heterozygosity and Polymorphism Information Content Value. *Theoretical Population Biology* 57:265-271.
- Singh RK, Jena SN, Khan S, Yadav S, Banarjee N, Raghuvanshi S, Bhardwaj V, Dattamajunder SK, Kapur R, Solomon S, Swapna M, Srivastava S, Tyagi AK (2013) Development, cross-species/genera transferability of novel EST-SSR markers and their utility in revealing population structure and genetic diversity in sugarcane. *Gene* 524:309-329.
- Song S, Dey DK, Holsinger KE (2011) Genetic diversity of microsatellite loci in hierarchically structured populations. *Theoretical Population Biology* 80:29-37.
- Sorrells ME, Wilson WA (1997) Direct classification and selection of superior alleles for crop improvement. *Crop Science* 37:691-697.
- Thiel T, Michalek W, Varshney RK (2003) Exploiting EST database for the development and characterization of gene derived SSR markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106:411-22.
- Troyer AF, Openshaw SJ, Knittle KH (1998) Measurement of genetic diversity among popular commercial corn hybrids. *Crop Science* 28:481-485.

Wan H, Wootton JC (2000) A global compositional complexity measure for biological sequences: AT-rich and GC-rich genomes encode less complex proteins. *Computers and Chemistry* 24:71-94.

Ya-ming G, Sheng-chun XU, Wei-hua M, Ze-yun L, Qizhan H, Gu-wen Z Ju D (2011) Genetic Diversity Analysis of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Based on EST-SSR Markers. *Agricultural Sciences in China* 10:838-844.

Yang J, Daib P, Zhou T, Huang Z, Feng L, Su H, Liu Z, Zhao G (2013) Genetic diversity and structure of wintersweet (*Chimonanthus praecox*) revealed by EST-SSR markers. *Scientia Horticulturae* 150:1-10.

Zeid M, Yu JK, Goldowitz I, Denton ME, Costich DE, Jayasuriya CT, Saha M, Elshire R, Benscher D, Breseghello F, Munkvold J, Varshney RK, Belay G, Sorrells ME (2010) Cross-amplification of EST-derived markers among 16 grass species. *Field Crops Research* 118:28-35

Zouari N, Been-Saad R, Leqarre T, Azaza J, Sabau X, Jaoua M, Masmoudi K, Hassairi A (2007) Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Gene* 404:61-69.