ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٥٦٦-٥٥٧

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

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

مریم میدانسری[1]، قربانعلی نعمت‌زاده[1]، احسان شکری[*2]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

Meidansari M[1], Nematzadeh GH[1], 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: ۹٤/۷/۱۹)

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 (غیرکدکننده- 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 ١٦ نشانگر با چند شکلی مناسب (ALES)، برای بررسی‌های ژنومی معرفی شد. نتایج نشان داد که تعداد ریزماهواره در نواحی کد کننده در این گیاه زیاد (٦/٧ درصد) و مشابه با گیاه برنج (٤/٧ درصد) است. همچنین موتیف‌های tg، (gcg- gaa) و ttga بیشترین انواع موتیف ریزماهواره را در بانک اطلاعاتیEST 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 پلاسم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی
آلوروپوس لیتورالیس
بیوانفورماتیک
ریزماهواره
EST-SSR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

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 طوری‌که 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 ژرم‌پلاسم، پیشرفت برنامه‌های بهنژادی و استفاده بهینه از خزانه‌های ژنی می‌شود. علاوه براین می‌تواند راه‌کارهای 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 هم‌بارز، 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. 2011; Chai et al. 2013 ; Jugran et al. 2013). 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. 1997; Li et al. 2011; Barati et al. 2012). 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 ٤٠٧٦٦٣ رکورد EST مورد مطالعه مشاهده شد. براین اساس ١٣٦٧ جفت آغازگر طراحی شد و پس از بررسی ژنومی مشخص شد، که آغازگرهای طراحی شده در ٧١٥ مورد از کیفیت بالای تکثیر و انتقال‌پذیری مناسب بین گونه‌ای برخوردار هستند. در این تحقیق موتیف‌های سه نوکلئوتیدی در گندم با ٤٧/٤٣ درصد، ذرت ٤٢/٧٨ درصد، برنج ٥٥/٤ درصد، سورگوم ٤١/٢٣ درصد و موتیف‌های چهار نوکلئوتیدی با ٢٨/٠٦ 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 هم‌بارزی، تکرارپذیری بالا و الگوی تکثیر شفاف، می‌توانند ابزار مفیدی برای آنالیز سطح تنوع ژنتیکی بخش‌های عملکردی ژنوم باشند. Li-Bin et al. (2008) با استفاده از ٥٠ جفت آغازگر طراحی شده از نواحی ریزماهواره موجود در رکوردهای EST گیاه کنجد، ژنوتیپ‌های کنجد را در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

چهار گروه اصلی جای دادند. میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرهای مورد مطالعه از ۰/۱ تا ۰/۸٤ 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. (2012) .Ma et al نشان دادند نشانگرهای EST-SSR بدست آمده از کتابخانه گیاه چای از کارایی مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح مولکولی در چای 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 تک لپه‌ای از خانواده گرامینه بوده که چهار گونه آن به نام‌های *Aeluropus littoralis*، *Aeluropus lagopoides*، *Aeluropus Macrostachyus* 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

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 توالی هایی که شامل حداقل پنج تکرار ۲، ۳، ٤ و ۵ نوکلئوتیدی بودند، انتخاب شدند. در گام بعدی ترادف‌هایی که واجد شرایط طراحی آغازگر بودند به نرم افزار PRIMER ۳ معرفی شدند. در این طراحی، درصد GC بین ٤۵ تا ٦۰ ، دمای اتصال ٦۰ درجه سانتی-گراد و طول آغازگرها ۱۸ تا ۲۷ باز در نظر گرفته‌شد (جدول ۲).

ارزیابی‌های مولکولی

به منظور بررسی تنوع‌ژنتیکی، 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 ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر (۲٦۰/۲۸۰) در تعیین درجه خلوص DNA استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD, USA) و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۹۲ درجه سانتی-گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ٦٤-۵۲ 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 باندی شفافی را روی ژل آگارز ارائه ندادند با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ٦ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل-ها با استفاده از روش نیترات نقره صورت گرفت.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

جدول۱- محل جمع آوری اکوتیپ‌های مورد استفاده

محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (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	۳٤	۸۷۸	D
آذربایجان شرقی،بندر شرفخانه نزدیک ساحل	٤۵	۳۸	۱۲۹۰	E
جاده قدیمی کاشان -قم،مشکان ۱۰۰۰ متر درون کویر	۵۱	۳٤	۸۵۱	F
جاده کرج-اشتهارد،روستای جعفر آباد	۵۰	۳۵	۱۱۵٦	G
جاده قوشچی-ارومیه شرکت ایران نشاط	٤۵	۳۷	۱۳۰۰	H
شهر وایقان شبستر	٤۵	۳۸	۱۲۹۹	I
اتوبان قم-تهران	۵۰	۳۵	۱۱۵۳	J
جاده صوفیان-شبستر،روستای علیشاه	٤۵	۳۸	۱۳۰٦	K
جاده نهبندان به بیرجند، بعد از پلیس راه خوسف، دریاچه فیروز آباد	۵۹	۳۲	۱۳٦۲	L
جاده زاهدان به زابل، منطقه ارمک،۵۰ کیلومتر مانده به زاهدان	٦۰	۲۹	۸۲٤	M
اتوبان قم-تهران،بعد از بهشت معصومه	۵۰	۳٤	۸۷۷	N
کاشان،ابوزید،۲۰کیلومتری جاده حاکی درون کویر، رود خشک قندی آباد	۵۱	۳٤	۱۰۱٤	O
سراب منطقه قشلاق حدود ۱۰ کیلومتری سراب	٤۷	۳۷	۱٦۵۸	P
جاده سرباز به ایرانشهر، روستای رسول آباد	٦۰	۲۷	۵۵۸	Q
جاده بندر عباس-فورک	۵۵	۲۸	٦۷٦	R
جاده سروستان به فسا،پلاک ٤۰ 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_i و P_j 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 کوفنتیک بهترین الگوریتم خوشه‌بندی و ضریب مشابهت انتخاب و دندوگرام اکوتیپ‌ها بر اساس آن ترسیم شد. پلات سه بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) نیز با استفاده از نرم افزار NTSYS pc ۲/۰ بدست آمد و از نتایج آن برای افزایش دقت گروه‌بندی استفاده شد.

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 ٤۷۲ رکورد EST به دست آمده متعلق به جنس آلوروپوس، تعداد ۳۲ مورد (٦/۷ درصد) حاوی نواحی ریزماهواره بودند که از این تعداد در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

جدول ۲- مشخصات جایگاه‌های مورد استفاده در این مطالعه

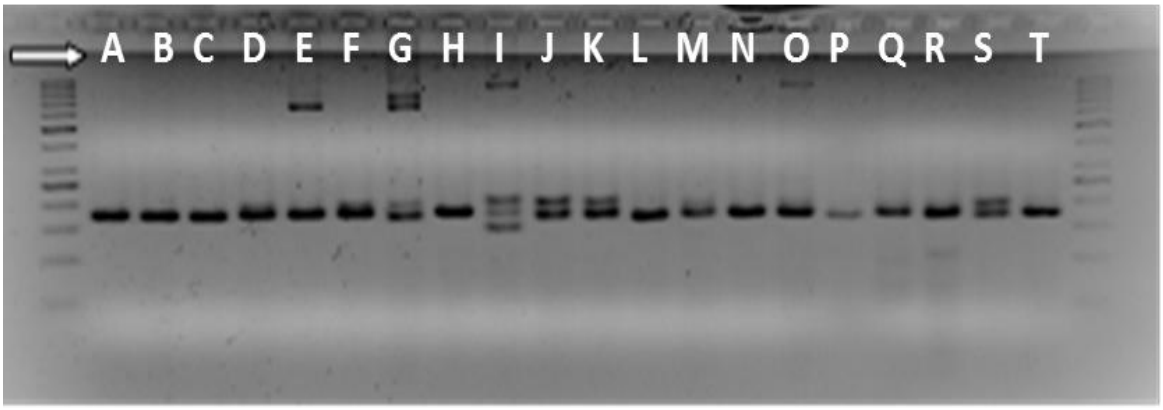
جایگاه	نوع موتیف	آغازگر رفت ('۳– '۵)	آغازگر برگشت ('۳– '۵)
ALES1	(GAA)9	TGACAAGGCATCAGCTTAAGAA	TAAAGGAAACGATCAGCACGTA
ALES2	(CG)6	AGAGGGAGGGATATAGCGAAAC	ACTAGTAGCAAGCGCAAACACA
ALES3	(GT)5	ACAAGTAGTAGGCGGGTTCGTA	GTCCATGGTTTACAACAACACG
ALES4	(TG)5	TTGGTCGAATGATGTCTTTGTC	CAGATCACGGTTCACTTATCCA
ALES5	(TG)7	AGGTAGAATAACGGGCAATTCA	TGCAGTAGACAAGAGCAACACA
ALES6	(CAG)11	GGTGTGTTCGATGATGTGAACT	CCACTGATGTCACTCATCTGGT
ALES7	(GCG)5	AGGCTCAAGCAATCATGCTTAT	CTTTGCTTACAATCCTGTCACG
ALES8	(AT)5(AC)6	AGGAGGTGATTCGTCCAAAATA	TGACATACATAAGACCCCGACA
ALES9	(ACA)7	AAGAGACTTCTTGCATTTGTGG	CCAACTTGCTTGGGATAAAAAG
ALES10	(CG)6	AGAGGGAGGGATATAGCGAAAC	TTCTAGTAGCAAGCGCAAACAC
ALES11	(TC)5	GCAAGACAGAACCCCAATAAAG	CCGAAAAATCCCTAAGACACAG
ALES12	(GAA)9	CTATCTGTTAAGCGCATTGCTG	AGTTCGCCAGACTCAAAAAGAG
ALES13	(TTGA)5	CTTCTTCCCTCTTCCTCTTCG	GATTTCAGAGCTGATCCAACCT
ALES14	(atgc)5	CGATGAAATGTGATGTGATGTG	AACCAGCAAGGTCATGAAGATT
ALES15	(GCA)10	TTCACTCCCTTCGGCTGAT	AAATGCTACACATTTGCCTCCT
ALES16	(GCG)7	TCCTCGCATCACCCTATAAATC	CTCTTGGAACCTTCTCCTCCTC
ALES17	(AC)6	CATACGAAGAATGAATGGGACA	TGGAGAAGAGAGGCATCTTAGG
ALES18	(CAA)5	ATTTTGGAATGGGAGGAGGT	ATTTACTGCGCGTGTGTGAG

جدول۳- 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	٥٦/٢٥
سه نوکلئوتیدی	GAA,CTA,ACC,CAG,GCG,CAA,ACA,GCA	۷/۱	٣٤/٣٧
چهار نوکلئوتیدی	TTGA,ATGC	٥	٩/٣٧

۱۸ مورد طول و شرایط نواحی مجاور تکرارهای ریزماهواره، 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 ریزماهواره به طور میانگین در غلات ۳/۲ درصد می باشد به طوری‌که ذرت با ۱/۵ درصد و برنج با ٤/۷ درصد به ترتیب کمترین و بیشترین فراوانی ریزماهواره را در رکوردهای EST خود داشتند. با بررسی رکوردهای محدود EST در گیاه آلوروپوس، به نظر می‌رسد در این گیاه (٦/۷ درصد) همانند برنج (٤/۷ درصد) درصد بالایی از ریزماهواره در نواحی کد کننده وجود دارد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که برخی نواحی ریزماهواره در تنظیم بیان ژن و پیرایش RNA دخالت دارند و تعداد و نوع تکرارهای ریزماهواره 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 (٥٦ درصد) و سه نوکلئوتیدی (٣٤ 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،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]



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).

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، gcg- gaa 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 براین 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 ترانسکریپتوم می‌توان مقایسه دقیق‌تری 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 (جدول۳)، 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 آللی قابل امتیازدهی ایجاد کردند. عدم تکثیر در ۷ ALES و ۱۷ ALES احتمالا ناشی از تغییر توالی‌های هدف به سبب موتاسیون‌های نقطه‌ای، حذف یا معکوس شدن و یا تغییر توالی‌های حاشیه‌ای جایگاه‌های ریزماهواره می‌باشد. الگوی تکثیر نشانگر ALES ۱٤ برای اکوتیپ‌های آلوروپوس لیتورالیس در شکل ۱ نشان داده شده‌است. در مجموع ۵۷ مکان ژنی با ۸۹ درصد چند شکلی و میانگین ۳/٦ آلل به ازای هرجفت آغازگر با استفاده از ۱٦ 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 ALESهای ٤، ٦ و ۱٦ هر کدام با یک جایگاه بود. همچنین

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

جدول ٤- اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی آغازگرها

کل جایگاه‌ها	جایگاه‌های چند شکل	ارزش PIC	ارزش D	جایگاه
٣	٢	٠/٣٧	٠/٤٩	ALES1
٧	٧	٠/٢٨	٠/٣٤	ALES2
٢	٢	٠/٣٧	٠/٥	ALES3
٢	١	٠/٢٧	٠/٣٢	ALES4
٣	٢	٠/٢٨	٠/٣٤	ALES5
١	١	٠/٢٧	٠/٣٢	ALES6
٦	٦	٠/٣٣	٠/٤١	ALES7
٤	٤	٠/٣٣	٠/٣٧	ALES8
٧	٧	٠/٢٩	٠/٣٤	ALES9
٤	٣	٠/٣٥	٠/٤٦	ALES10
٣	٣	٠/٣٧	٠/٥	ALES11
٥	٥	٠/٣٢	٠/٤	ALES12
٣	٢	٠/٣٧	٠/٤٩	ALES13
٤	٤	٠/٣٦	٠/٤٨	ALES14
٣	٣	٠/٣٧	٠/٥	ALES15
١	١	٠/٢٧	٠/٣٢	ALES16

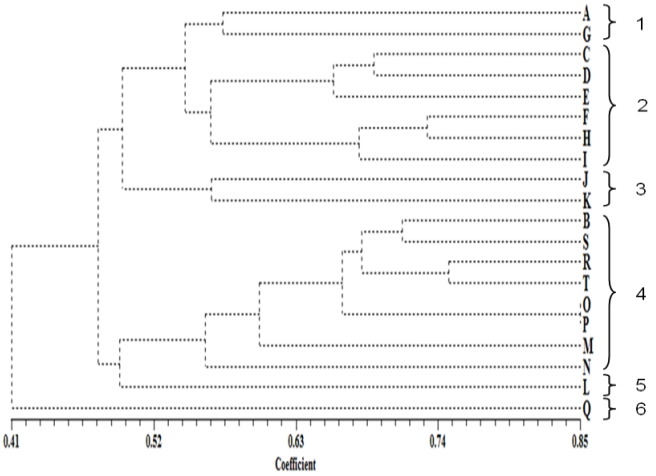
تعداد آلل‌های تکثیر شده توسط هر نشانگر در دامنه‌ای از یک تا هفت عدد و دامنه طول باندهای تکثیر شده نیز از ١٠٠ جفت باز تا ١٠٠٠ جفت باز متغیر بود. شاخص میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای نشانگرهای مورد بررسی بین ٠/٢٧ و ٠/٣٧ با میانگین ٠/٣٢ محاسبه شد که از این لحاظ، نشانگرهای ١٥، ١٣، ١١، ٣، ١ ALES با کسب ماکزیمم میزان چند شکلی (٠/٣٧)، قدرت تمایز بالاتری برای این گروه از اکوتیپ‌ها نشان دادند (جدول ٤).

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 ١٦، ٦ و ٤ ALES با ٠/٢٧ 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 پلاسم می‌باشد. از نظر شاخص تنوع ژنی (H) نشانگرهای ١ ALES و ١٣ ALES بیشترین (H= ٠/٤٩) و ٤ ALES، ٦ ALES و ١٦ ALES کمترین (H= ٠/٣٢) مقدار را نشان دادند.

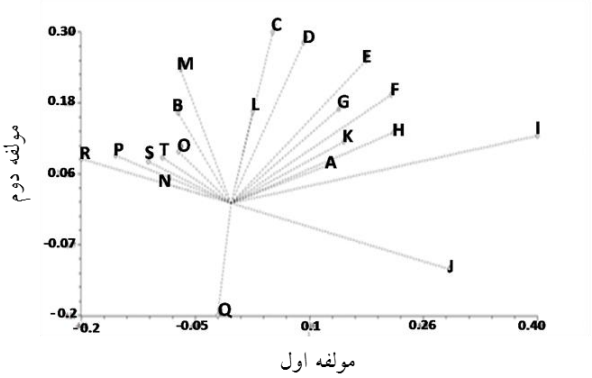
تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب فاصله جاکارد ژنوتیپ‌های آلوروپوس را به شش گروه منتسب کرد. بر این اساس نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرکز (استان های تهران، قم و اصفهان) در دو گروه (دوم و چهارم) همراه با نمونه‌های شمال غرب و جنوب- شرق کشور هم‌گروه شدند. به نظر می‌رسد وجود اکوتیپ‌های جمع‌آوری 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 ٢)، 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

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 بدست‌آمده از مرکز و پراکندگی در گروه‌های مختلف مطابق آنچه در روش تجزیه خوشه‌ای مشاهده شد را تأیید می‌کند (شکل۳).



شکل۲- دندروگرام داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی EST-SSR با استفاده از الگوریتم میانگین فاصله (UPMGA). علامت اختصاری در جدول ۱ توضیح داده شده‌است.



شکل۳- نمودار دو بعدی اکوتیپ‌های آلوروپوس لیتورالیس بر اساس مولفه‌های 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 (٤٥ درصد) در نواحی کدکننده وجود دارد. Ahmed et al. (2011) با استفاده از نشانگر RAPD بیش از ۵۰ درصد تنوع داخل جمعیت‌های 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 شده‌است. 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. نهایتا، در این مطالعه برای اولین بار شانزده نشانگر اختصاصی EST-SSR (ALES) در گیاه آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از بیوانفوماتیک و کاوش کتابخانه EST معرفی‌شد. 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 نسبتا پایین توسعه این نشانگرها در مقایسه با ریزماهواره‌های بدست آمده از کتابخانه‌های ژنومی، قابل توجه است. این نشانگرها می‌توانند برای شناخت ژرم‌پلاسم 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

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 minipreparation 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 492375-381.
Jiang L, Wanga L, Liu L, Zhu X, Zhai L, Gonga 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. Bioinformation 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, Szewe-McFadden AK, Bliek 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 speciesand 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, Dattamajumder 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]

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 *Aleuropus littoralis*. Gene 404:61-69.

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, Qi-zan H, Gu-wen Z Ju D (2011) Genetic Diversity Analysis of Faba Bean (*Vicia fabaL.*) Based on EST-SSR Markers. Agricultural Sciences in China 10:838-844.

Yang J, Daib P, Zhou T, Huanga 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.11.3]