



بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چمن شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انتقال پذیر مبتنی بر EST

مریم میدانسری^۱، قربانعلی نعمت زاده^۲، نجمه نصیری^۳ و احسان شکری^۴

۱، ۲، ۳- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، استاد و دکترای مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- دکترای نانوبیوتکنولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی تبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

(نویسنده مسئول: e.shokri62@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۳

چکیده

گیاه چمن شور ساحلی یکی از موفق ترین گراس های تک لپه مطرح از نظر تحمل به شوری های زیاد است که ارزش علوفه ای داشته و دارای خصوصیات فیزیولوژیک ارزشمندی است. هدف از این مطالعه معرفی و دسترسی سریع به نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA و بررسی تنوع ژنتیکی در گونه شورزی و ارزشمند چمن شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*) می باشد. بدین منظور آزمون تکثیر ژنومی در این گیاه با استفاده از ۱۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره EST بدست آمده از گونه های گندم، برنج و جو برای شناسایی نشانگرهای انتقال پذیر انجام گرفت. بر این اساس میزان کل انتقال پذیری نشانگرهای ریزماهواره EST با منشاء غلات در گیاه چمن شور ساحلی ۴۴ درصد بدست آمد. این نتیجه نشان می دهد که از مخزن نشانگرهای ریزماهواره غلات می توان برای دستیابی و توسعه نشانگرهای مولکولی در سایر گونه های ارزشمند خویشاوند با صرف کمترین زمان و هزینه استفاده نمود. در ادامه به منظور بررسی میزان کارآمدی نشانگرهای انتقال پذیر شناسایی شده در ارزیابی سطح تنوع و گروه بندی ژنتیکی، از ۱۲ جفت نشانگر انتقال پذیر استفاده گردید. در مجموع ۷۴ مکان ژنی با میانگین ۶/۱ آلل به ازای هر جفت آغازگر تکثیر شدند که بیش از ۹۰ درصد آن ها چندشکل بودند. شاخص PIC برای نشانگرهای مورد بررسی بین ۰/۲۶ و ۰/۳۸ و میانگین ۰/۳۳ محاسبه شد. در نهایت تجزیه خوشه ای، اکوتیپ های آلوروپوس را در ۷ گروه دسته بندی کرد. بر این اساس اکوتیپ ها از لحاظ فاصله جغرافیایی نسبتاً از هم تفکیک شدند و میزان چند شکلی افراد و تفاوت گروه ها با مشاهدات ظاهری و تنوع کیفی بین نمونه ها مطابقت بالایی داشت.

واژه های کلیدی: انتقال پذیری، تنوع ژنتیکی، چمن شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*)، ریزماهواره EST

مقدمه

توالی های تکراری ساده (ریزماهواره) آرایشی از توالی های کوتاه ۱ تا ۶ جفت بازی هستند که سطح بالایی از چندشکلی طولی را نشان می دهند (۴،۸) و نسبت به سایر نشانگرهای مولکولی از مزایای بسیاری مثل توارث همباز، تکثیر آسان و پوشش گسترده ژنوم برخوردار هستند. نشانگرهای ریز ما هواره به طور گسترده در تشخیص ژنی، ارزیابی تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه های لینکازی و انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS) به کار گرفته می شوند. با وجود مزایای فراوان، توسعه نشانگرهای ریزماهواره از روی DNA ژنومی فرآیندی زمان بر و پرهزینه است. اخیراً با توسعه ژنومیکس عملکردی تعداد زیادی از رکوردهای EST^۱ مربوط به گیاهان مختلف از جمله غلات در بانک ژن NCBI^۲ قرار گرفته که منبعی غنی برای استخراج ریزماهواره از EST می باشد (۱،۳،۱۸).

رکوردهای EST بخش کوچکی از توالی ژنوم هستند (معمولاً ۴۰۰ تا ۸۰۰ جفت باز) که از انتهای ۳' و ۵' یک ژن بیان شونده به دست می آیند. اگرچه EST اطلاعات ناقصی را تولید می کند، اما از این جهت که اطلاعات زیستی معنی داری را بوجود می آورد، ارزشمند است (۴). به علاوه ریزماهواره EST از نواحی رمزکننده ژن ها که در گونه های نزدیک بخوبی حفاظت شده اند، استخراج می شوند و به همین دلیل از یک گونه به گونه دیگر انتقال پذیری بالایی

دارند و می توانند در نشانمند ساختن و نقشه یابی ژن ها مؤثرتر باشند (۱۲).

از آنجائی که ریزماهواره های EST از مناطق اگزونی بدست می آیند، معمولاً نسبت به ریزماهواره های ژنومی چندشکلی کمتری دارند اما چون چندشکلی بدست آمده از آن ها مربوط به ناحیه کدشونده ژنوم بوده و بازتابی از تنوع ژنتیکی قابل دستیابی در نواحی عملکردی ژنوم می باشد، می تواند اطلاعات اصلاحی مفیدی را فراهم کند (۱۰).

گیاه چمن شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*) از هالوفیت های چندساله تک لپه ای متعلق به خانواده گندمیان بوده که می تواند در معرض شوری بالایی قرار گرفته و به طور طبیعی رشد کند، بدون اینکه علائم سمیت را نشان دهد (۲). این گیاه دیپلوئید (2n=2x=14) بوده و ژنوم کوچکی در حدود ۳۴۲Mb دارد (۱۹). چمن شور ساحلی از مدت ها پیش از جهت ارزش مرتعداری و ویژگی های فیزیولوژیکی مثل مقاومت به تنش شوری مورد توجه بوده (۱۷) و از دیدگاه متخصصان فیزیولوژی مولکولی مدل ژنتیکی ارزشمندی برای درک سازوکارهای مقاومت به شوری می باشد.

قابلیت تکثیر جایگاه های ریزماهواره EST در گونه های نزدیک بهم اثبات شده است، لذا می توان به راحتی از آن ها در طبقه بندی انواع ژرم پلاسما های گونه های هم جنس استفاده نمود. چای و همکاران (۴) در تحقیقی تعداد ۲۱۲ نشانگر ریزماهواره EST مربوط به گیاه گریپ فروت چینی

(Pummelo) به منظور بررسی انتقال پذیری بین جنس‌های مرکبات، بررسی چندشکلی و تنوع ژنتیکی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد ۷۳ درصد از باندهای تکثیر شده بین جنس‌های مورد بررسی انتقال پذیر است. همچنین ۵۳ درصد از نشانگرها چندشکلی نشان داده و در نقشه‌یابی جمعیت به کار گرفته شدند.

لی و همکاران (۹) تعداد ۴۰۷۶۶۳ رکورد EST را برای گونه‌های گندم، جو، ذرت، برنج و سورگوم از پایگاه داده‌های EST بانک ژن بدست آورده و برای یافتن ریزماهوره مورد استفاده قرار دادند. در مجموع، ۱۳۶۷ جفت آغازگر ریزماهوره EST طراحی شد که ۷۱۵ مورد آن بر روی گندم، برنج، ذرت، کتان و سویا، تحت شرایط PCR مشابه بررسی شد و درجه انتقال پذیری در این ۵ گیاه به ترتیب ۶۹/۹۳، ۵۳/۵۷، ۶۳/۲۲، ۴۹/۹۳ و ۵۶/۲۷ درصد بدست آمد.

در مطالعه دیگری سیم و همکاران (۱۶) کاربرد ریزماهوره‌های EST غلات را در چاودار وحشی بررسی کردند. در مجموع تعداد ۱۶۵ نشانگر ریزماهوره EST غلات بررسی شد که درصد بالایی از انتقال پذیری (۵۷ درصد) و چندشکلی (۶۷ درصد) بدست آمد. این محققین گزارش کردند که ریزماهوره‌های EST به دست آمده انتقال پذیری بین گونه‌ای قابل توجهی را بین گونه‌های نزدیک به هم نشان دادند به طوری که درصد بالای انتقال پذیری ریزماهوره EST بین غلات و چاودار وحشی به اثبات رسید.

لی فانگ و همکاران (۱۰) بر اساس رکوردهای EST گزارش شده مربوط به تنش شوری در گندم، ۸۱ نشانگر ریزماهوره EST جدید را معرفی کردند. در نهایت، ۸۱ جایگاه تکثیر بوسیله ۴۳ نشانگر بر روی ۱۸ کروموزوم گندم نقشه‌یابی شدند. همچنین جایگاه کروموزومی تعدادی از این نشانگرهای ریزماهوره EST که انتقال پذیر بودند و جایگاه خاصی را در چاودار تکثیر کردند، روی کروموزوم‌های R، 4R، 5R و 7R چاودار با موفقیت نقشه‌یابی گردیدند. این

نتایج به وضوح انتقال پذیری بالای شانگرهای EST- ریزماهوره را در بین جنس‌ها و گونه‌های نزدیک نشان می‌دهد. در مجموع با توجه به قیمت ارزان، سرعت توسعه و کارآمدی نشانگرهای ریزماهوره EST، استفاده از این نشانگرها در مطالعات ژنتیکی از توجیه علمی، تکنیکی و اقتصادی لازم برخوردار است و این نشانگرها ابزارهای مناسبی برای انواع اهداف شامل تجزیه روابط شجره‌ای، مطالعه ارتباط نشانگر- صفت، ژنومیکس مقایسه‌ای، مطالعه بیان ژن و مکان‌یابی‌های مقایسه‌ای هستند.

اهداف مطالعه حاضر، بررسی میزان انتقال پذیری، شناسایی نشانگرهای انتقال پذیر از غلات به چمن شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*) و توسعه سریع نشانگرهای مولکولی ارزان قیمت و همچنین برآورد اولیه کارایی نشانگرهای معرفی شده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و برآورد فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مختلف گیاه چمن شور ساحلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد نیاز در این تحقیق مشتمل بر ۲۰ اکوتیپ مختلف گونه گیاه چمن شور ساحلی می‌باشد که در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری (جدول ۱) و بذریه یا قلمه آن در گلخانه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تکثیر گردید. در جمع‌آوری اکوتیپ‌ها ارتفاع از سطح دریا و عرض‌های جغرافیایی متفاوت مدنظر قرار گرفت. با توجه به این که کشور ایران بین ۲۵ تا ۴۰ درجه عرض شمالی قرار دارد، از فاصله بین مدارهای ۴۰ درجه شمالی و ۳۵ درجه تعداد ۹ نمونه، از فاصله بین مدارهای ۳۵ و ۳۰ درجه ۷ نمونه و از فاصله بین مدارهای ۳۰ درجه و ۲۵ درجه تعداد ۴ نمونه جمع‌آوری گردید.

جدول ۱- منشأ جغرافیایی (محل جمع‌آوری) اکوتیپ‌های گیاه چمن شور ساحلی

Table 1. Geographic origins (place of collection) of *A. littoralis* ecotypes

محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع	کد اصلی
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- اشتراردروستای 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 نهندان به بیرجند، بعد از پلیس راه خواف، دریاچه فیروز آباد	۵۹	۳۲	۱۳۲۲	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 خاکی درون کویر، رود خشک قندی	۵۱	۳۴	۱۰۱۴	O
سراب منطقه قشلاق حدود ۱۰ کیلومتری سراب	۴۷	۳۷	۱۶۵۸	P
جاده سرپاز 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 خواف، ۱۰ کیلومتری مهدی آباد داخل رودخانه شور	۵۹	۳۳	۱۱۲۲	T

آزمون تکثیر و تعیین انتقال پذیری

مجموعه‌ای متشکل از ۱۱۰ جفت آغازگر ریزوماهواره EST با منشاء غلات شامل برنج، گندم و جو جهت بررسی میزان انتقال پذیری و آزمون تکثیر با استفاده از ژنوم گیاه چمن شور ساحلی انتخاب گردیدند. این مجموعه از آغازگرها قبلاً انتقال پذیری خود را حداقل در سه مورد از گیاهان خانواده گرامینه شامل گندم، جو و برنج نشان داده بودند (۷، ۱۱). برای این منظور DNA ژنومی هر ۲۰ اکوتیپ با هم مخلوط و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با عنوان الگو استفاده شد. بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر نشانگر مولکولی ریزوماهواره EST بر اساس روش Monica و همکاران (۱۳) با اندکی تغییر انجام شد.

به جز دمای اتصال (محدوده دمایی بین ۶۴-۵۲)، برنامه تنظیم شده برای تمامی آغازگرها یکسان بود. در این آزمون هر جفت آغازگری که موفق به تکثیر با استفاده از ژنوم گیاه مورد نظر شد و الگوی بانندی واضحی ایجاد کرد، بعنوان نشانگر قابل انتقال (GTES: Graminea Transferable EST SSR) محسوب گردید.

ارزیابی مولکولی

در گام بعدی، تعدادی از نشانگرهای GTES (۱۲ مورد) بر اساس کیفیت تکثیر برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

Table 2. Description of the used primers

آغازگر Primer	نوع توالی Motif	توالی رفت Forward 3' → 5'	توالی برگشت Reverse 5' → 3'	دمای اتصال Annealing Tm
GTES ۱	(CCG) ^۷	F:CAAAGGAAGAGGCCAGTC	R:GTAGTCCGGAAGTGTGCTCA	۵۵
GTES ۲	(GGC) ^۵ (CCG) ^۵	F:AACATCACCGTCAACGAGG	R:TAGGATAATTGGCCAGCGAG	۵۵
GTES ۳	(CCG) ^۸	F:GGCAACCTACTGCGCTAC	R:ATTTACAACCTGCGGGTCAG	۵۵
GTES ۴	(CCT) ^۶	F:ACTCGAGAGAGGCTGACGAC	R:GTTCTTGCGGAACGACCTC	۵۵
GTES ۵	(CCCT) ^۶	F:CGACACAGACGAGAAGCAA	R:GGAGCATCAAAATTGGAGGA	۵۵
GTES ۶	(AG) ^{۱۱}	F:AAAGATAAGCGCGCTCTGC	R:CACCATGATGCAGTGAAGTC	۵۴
GTES ۷	(AGC) ^۵ (AAC) ^{۱۴}	F:GCAGCCGCAACCATTTGAC	R:ACAATTCTCGCAGCAGTTGG	۵۸
GTES ۸	(AAC) ^۹	F:GACAAGTCCACATAGGAGG	R:TAACACCTGATGGGTGGAGG	۵۴
GTES ۹	(GG) ^۸	F:CCGGCCCGAGGAAAAGCT	R:GGCCGAAGAGCGGTAGATCTT	۶۰
GTES ۱۰	(GGC) ^۴ (GGC) ^۳	F:CGAGAAGAAGTGGTGTCTGT	R:AGGTCGTGGAAGTCTTTGG	۵۵
GTES ۱۱	(GAC) ^۷	F:CTACGGCATCAGGAAGCTC	R:CCATACACCGCATCTCTGTG	۵۴
GTES ۱۲	(CGG) ^۵	F:CCAAGAAGCGCAAGAAGC	R:CTGGAAGTCTCCGACTCCT	۵۵

(وجود باند) امتیازدهی شدند. برای هر جایگاه پارامترهای میزان اطلاعات چندشکل (PIC) و تنوع ژنی (D) از رابطه‌های زیر برآورد شدند (۱۱):

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

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

در این رابطه‌ها P_i و P_j به ترتیب فراوانی آلل‌های i و j در یک جایگاه ریزوماهواره می‌باشد. سپس ضرایب تشابه مختلف (جاکارد، دایس و تطابق ساده) با استفاده از نرم افزار NTSYS pc 2.0 محاسبه گردید 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 انتخاب و دندروگرام اکوتیپ‌ها بر اساس آن ترسیم شد. پلات سه بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) نیز با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc2.0 بدست آمد.

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی، DNA ژنومی از برگ اکوتیپ‌ها به روش دلاپورتا و همکاران (۵) استخراج شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین گردید. واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و با استفاده از نشانگرهای GTES (۱۲ مورد) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۲-۵۲ درجه سانتی‌گراد (بسته به دمای ذوب آغازگر) به مدت ۱ 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 تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۲/۵ درصد تفکیک شدند. محصولاتی که الگوی بانندی شفاف را روی ژل آگارز ارائه ندادند با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته ساز ۶ درصد تفکیک شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوهای نواری به‌صورت صفر (عدم وجود باند) و یک

نتایج و بحث

ارزیابی انتقال پذیری و شناسایی نشانگرهای انتقال پذیر از گرامینه‌ها (برنج، گندم و جو) به گیاه چمن شور ساحلی

در این تحقیق میزان کل انتقال پذیری نشانگرهای ریزوماهواره EST با منشاء غلات در گیاه چمن شور ساحلی ۴۴ درصد بدست آمد. همچنین مشخص گردید که بیشترین انتقال پذیری از ژنوم برنج به میزان ۴۰ درصد و کمترین انتقال پذیری از ژنوم جو به میزان ۲۷ درصد وجود دارد. در تأیید این نتایج می‌توان به گزارش زواری و همکاران (۱۹) اشاره کرد که نشان دادند ۵۷ درصد از ۴۹۲ کلون EST مورد مطالعه در این گیاه (چمن شور ساحلی)، همولوژی بالایی را با رکوردهای EST گیاه برنج دارد. نزدیکی و مشابهت در نواحی کدکنده ژنوم دو گیاه چمن شور ساحلی و برنج، امکان بهره‌مندی از رویکردهای ژنومیکس مقایسه‌ای برای درک سازمان ژنومی و عملکردی به منظور اهداف اصلاحی چون مقاومت به تنش‌های غیرزیستی را فراهم می‌سازد.

ارزیابی چندشکلی و شاخص‌های نشانگری

در مجموع ۷۴ مکان ژنی با استفاده از ۱۲ نشانگر GTEs با میانگین ۶/۱ آلل به ازای هر جفت آغازگر تکثیر شدند که بیش از ۹۰ درصد آن‌ها چندشکل بودند. بیشترین تعداد مکان ژنی تکثیر شده قابل امتیازدهی مربوط به GTEs۴ با ۱۲ جایگاه و GTEs۶ با ۱۰ جایگاه و کمترین آن مربوط

به GTEsهای ۱۰ و ۱۱ با دو جایگاه بدست آمد (جدول ۳). در کل، تعداد مکان‌های تکثیر شده توسط هر آغازگر در دامنه‌ای از ۱ تا ۱۲ عدد و دامنه طول باند‌های تکثیر شده نیز از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت‌باز متغیر بود.

همچنین شاخص میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای نشانگرهای مورد بررسی بین ۰/۲۶ و ۰/۳۸ با میانگین ۰/۳۳ محاسبه شد که بیشترین مقدار به نشانگر GTEs۹ و کمترین مقدار آن به نشانگر GTEs۳ تعلق داشت (جدول ۳). مقادیر قابل توجه میانگین PIC برای کلیه آغازگرها حاکی از کارایی و توانمندی بالای روش نشانگرهای انتقال پذیر گرامینه در مطالعات ژنتیکی سایر گراس‌ها می‌باشد (۱۵). از نظر شاخص تنوع ژنی (D) نشانگرهای GTEs۷ و GTEs۹ (D=۰/۵) بیشترین و GTEs۳ (D=۰/۳۱) کمترین مقدار را داشت (جدول ۳). از آنجائی که تعداد آلل‌های تکثیر شده توسط یک نشانگر مناسب بودن آن جایگاه ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد، بنابراین نشانگرهای با تعداد آلل بیشتر و چند شکلی بالا برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر می‌باشند. لذا با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق (جدول ۳) به نظر می‌رسد نشانگرهای انتقال پذیر از گرامینه توانایی مناسبی از لحاظ تکثیر تعداد آلل و نمایش چندشکلی دارند. در جدول ۳ مقدار شاخص PIC برای هر آغازگر نشان داده شده است.

جدول ۳- کل باند‌های تکثیر شده، تعداد مکان‌های تکثیر شده چند شکل، میزان اطلاعات چندشکل و تنوع ژنی آغازگرهای انتقال پذیر GTEs مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ اکوتیپ گیاه چمن شور ساحلی

Table 3. Total amplified amplicons, number of amplified polymorph loci, polymorphism information content (PIC) and variation of GTEs transferable primers used for genetic diversity assessment of twenty ecotypes of *A. littoralis*

نشانگر	تنوع ژنی	میزان اطلاعات چندشکلی	باند‌های چندشکل	کل باندها
GTEs۱	۰/۴۶	۰/۳۵	۹	۹
GTEs۲	۰/۴۶	۰/۳۶	۵	۵
GTEs۳	۰/۳۱	۰/۲۶	۵	۵
GTEs۴	۰/۴۶	۰/۳۵	۱۲	۱۲
GTEs۵	۰/۴۷	۰/۳۶	۴	۴
GTEs۶	۰/۳۶	۰/۳	۱۰	۱۰
GTEs۷	۰/۵	۰/۳۷	۷	۷
GTEs۸	۰/۴۳	۰/۳۴	۱	۳
GTEs۹	۰/۵	۰/۳۷	۵	۶
GTEs۱۰	۰/۴۸	۰/۳۶	۲	۲
GTEs۱۱	۰/۳۲	۰/۲۷	۲	۲
GTEs۱۲	۰/۴۳	۰/۳۴	۹	۹

خط برش از طریق محاسبه میانگین ضریب تشابه برای تمام نمونه‌های مورد بررسی در فاصله ۰/۵۹ در نظر گرفته شد (شکل ۲). بر این اساس حدود ۴۰ درصد اختلاف در نواحی رمزکننده اکوتیپ‌های مورد بررسی وجود دارد. سجادی و همکاران (۱۴) با استفاده از نشانگر رید، ۵۰ درصد تنوع بین اکوتیپ‌های گیاه چمن شور ساحلی مشاهده کردند.

بطور کلی در مقایسه با سایر نشانگرهای غیر ژنی مثل ریزوماهواره‌های ژنومی و رید نشانگرهای ریزوماهواره EST به علت هدف قرار دادن نواحی ژنی یا نواحی که نسخه‌برداری می‌شوند، چند شکلی کمتری دارند زیرا سطح حفاظت‌شدگی بیشتری در نواحی ژنی وجود دارد. بیشتر نمونه‌های جمع‌آوری

به‌منظور انتخاب نوع معیار فاصله یا ضریب تشابه مناسب، پس از بررسی ضریب همبستگی کوفاکتیک بین ماتریس ضرایب مختلف، ماتریس ضرایب تشابه دایس انتخاب گردید. بر اساس ماتریس ضرایب تشابه دایس برای اکوتیپ‌های مختلف، کمترین و بیشترین درصد تشابه به ترتیب ۲۰ درصد بین اکوتیپ‌های S و Q (جاده سروستان به فساء با سرباز به ایرانشهر) و ۸۶ درصد بین اکوتیپ‌های D و F (قم-مشکان) می‌باشد. همچنین میانگین درصد تشابه ۵۹ درصد بدست آمد.

گروه‌بندی اکوتیپ‌ها و برآورد فاصله ژنتیکی

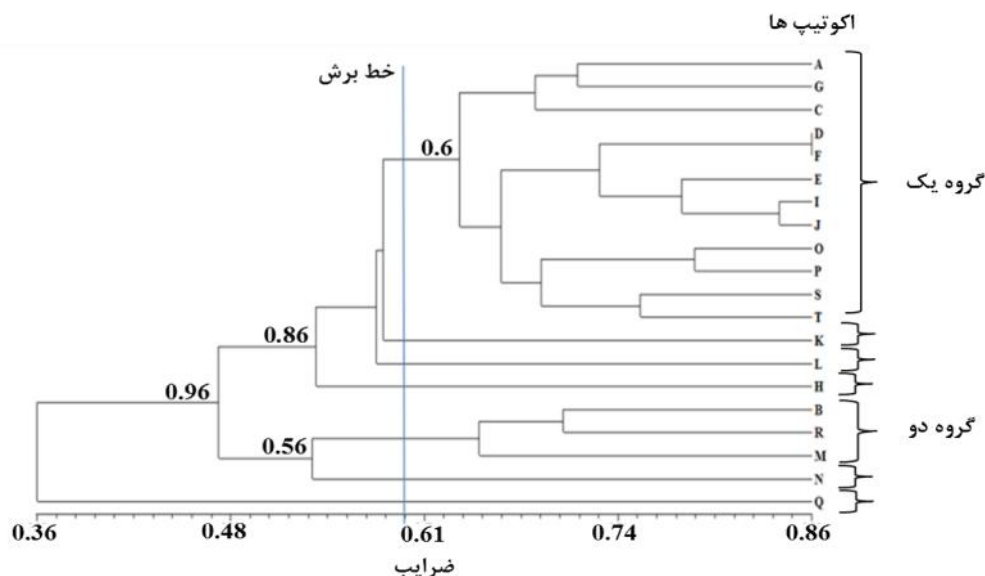
تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس، ژنوتیپ‌ها را به ۷ گروه دسته‌بندی کرد.

نزدیکی بیشتری با اکوتیپ‌های گروه یک و اکوتیپ N نیز فاصله کمتری با گروه دو نشان داد.

همچنین بر اساس تجزیه خوشه‌ای، 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). میانگین اختلاف اکوتیپ Q با همه اکوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس بیش از ۶۵ درصد بدست آمد، امری که احتمال انتقال فیزیکی از کشور همسایه یا احتمال وجود گیاهان بین گونه‌ای را در جنس آلورپوس به ذهن می‌رساند (شکل ۲).

شده از مرکز (استان‌های تهران (جنوب)، قم و اصفهان) و شمال غرب کشور در یک گروه (گروه یک) قرار گرفتند. بر این اساس گروه یک، شامل ۱۲ اکوتیپ (A, G, C, D, F, E, I, J, O, P, S, T) می‌شود که به سه زیر گروه تقسیم می‌شوند.

در گروه دوم نیز اکوتیپ‌هایی از مناطق قم-تهران، بندرعباس-فورک و زاهدان-زابل قرار گرفتند. بقیه اکوتیپ‌ها (شامل K, L, H, N و Q)، با هم هم‌گروه نشده و کلاس‌های تک‌عضوی ایجاد کردند. بطوریکه اکوتیپ‌های K, L و H



شکل ۱- دندروگرام داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی ریزماهوره EST با استفاده از روش (UPMGA). محل خط برش با در نظر گرفتن میانگین ضریب تشابه (۵۹/۰) اکوتیپ‌های مورد مطالعه تعیین شد. حروف A تا T کد شناسایی ۲۰ اکوتیپ‌های گیاه چمن شور ساحلی که اطلاعات کامل آن در جدول ۱ آورده شده است. گروه یک، شامل ۱۲ اکوتیپ (A, G, C, D, F, E, I, J, O, P, S, T) می‌شود که به سه زیر گروه تقسیم می‌شوند. گروه دوم شامل اکوتیپ‌هایی از مناطق قم-تهران (B)، بندرعباس-فورک (R) و زاهدان-زابل (M) قرار گرفتند. بقیه اکوتیپ‌ها (شامل K, L, H, N و Q)، با هم هم‌گروه نشده و کلاس‌های تک‌عضوی ایجاد کردند.

Figure 1. Cluster analysis using data obtained from the EST-microsatellite molecular markers based on UPGMA method. Cutoff line was determined according to the average similarity coefficient (59/0) of studied ecotypes. Letters A to T indicates the identification codes of 20 *A. littoralis* ecotypes, which are their complete descriptions was mentioned in table 1. Group I is consist of 12 ecotypes ((A, G, C, D, F, E, I, J, O, P, S, T), which are divided into three subgroups. The second group includes the ecotypes from Tehran -Qom (B), Bandar Abbas- Fork (R) and Zahedan- Zabol (M) regions. Other ecotypes (including: K, L, H, N و Q) are not grouped together and remained as single-member classes

میانگین ضریب تشابه پایین بین اکوتیپ‌های مرکزی در مقایسه با نمونه‌های سایر مناطق و تنوع ظاهری مشاهده شده بین نمونه‌های مرکزی (احتمال می‌رود مرکز تنوع برای این گیاه در ایران، مناطق مرکزی بوده و از آنجا به سایر نقاط منتقل شده باشد. بطور کلی نتایج گروه‌بندی داده‌های مولکولی با مناطق جغرافیایی در بسیاری از موارد با یکدیگر تطابق دارد. البته در برخی موارد نیز نمونه‌های مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف هم‌گروه شده‌اند. بعنوان مثال در زیرگروه سوم گروه یک، نمونه‌های مربوط به مناطق جغرافیایی متفاوت مانند: O (مرکز)، P (شمال غرب)، T (شرق) و S (جنوب) قرار گرفتند. با این وجود با بررسی بیشتر شرایط اقلیمی (نوسانات درجه حرارت، بارندگی، سطح تبخیر و وضعیت خاک) مشخص

بررسی بیشتر گروه‌ها و زیرگروه‌های ایجاد شده به روش تجزیه خوشه‌ای نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مرکزی با اکوتیپ‌های شمال غرب و مناطق شرقی و جنوبی کشور هم‌گروه می‌شوند و یا در یک زیرگروه قرار می‌گیرند. به نظر می‌رسد وجود اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مرکزی در اکثر گروه‌ها (بعنوان مثال اکوتیپ‌های D, F, I از مرکز با اکوتیپ‌های E و I از شمال غرب یا اکوتیپ B از مرکز با اکوتیپ‌های مناطق شرقی و جنوبی) و همچنین سطح بالای تفاوت ژنتیکی در این اکوتیپ‌ها نشان‌دهنده جریان ژنی می‌باشد.

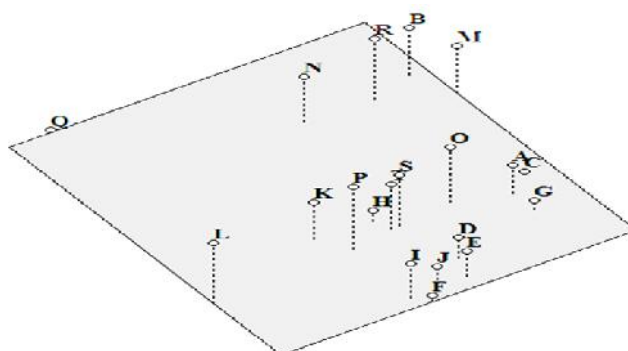
به‌طوری که طبق این نتایج (هم‌گروه شدن اکوتیپ‌های مرکزی با اکوتیپ‌های شمال غرب، مناطق شرقی و جنوبی،

تجزیه‌ای خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی خواهد شد (۶).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که با استفاده از مؤلفه‌های اول و دوم و سوم در مجموع ۱۲ درصد از تغییرات توجیه می‌شود. از نقطه نظر ژنتیکی این نتیجه نشان می‌دهد که نشانگرهای مورد بررسی از بخش‌های مختلف ژنوم نمونه‌برداری کرده‌اند و بنابراین دارای همبستگی کمتری هستند. همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که پراکندگی بسیار زیادی در اکوتیپ‌ها وجود داشته و اکوتیپ‌ها در سطح نمودار پراکنده هستند (شکل ۳). دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نیز مؤید پراکندگی زیاد اکوتیپ‌ها است. همچنین بر اساس تجزیه خوشه‌ای و PCA و ماتریس تشابه، بیشترین اختلاف بین اکوتیپ‌های S و Q وجود دارد. نتایج PCA با نتایج بدست‌آمده از روش تجزیه خوشه‌ای تا حد نسبتاً زیادی مشابه است.

گردید که اگر چه مناطق فوق دارای عرض‌های جغرافیایی متفاوت هستند، اما از نظر پارامترهای اقلیمی و شرایط آب و هوایی مشابهت بالایی دارند و لذا به تبع آن انتظار می‌رود، اکوتیپ‌های بدست آمده از این مناطق فشار انتخابی و تکاملی مشابهی را تجربه کرده باشند. بنابراین صرف توجه به عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا، بدون در نظر گرفتن شرایط اقلیمی و اکولوژیکی، می‌تواند گمراه‌کننده باشد.

همچنین قرار گرفتن نمونه‌های مربوط به شرایط جغرافیایی متفاوت در یک گروه می‌تواند به واسطه اختلاط‌های فیزیکی یا شباهت ژنتیکی بین نمونه‌ها باشد. در ادامه برای داشتن دیدگاه بهتر راجع به فواصل ژنتیکی بین نمونه‌ها و همچنین اهمیت نسبی لوکوس‌هایی که در گروه‌بندی نقش دارند، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)، انجام شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بعنوان مکمل



شکل ۲- پلات سه بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی. حروف A تا T کد شناسایی ۲۰ اکوتیپ‌های گیاه چمن شور ساحلی که اطلاعات کامل آن در جدول ۱ آورده شده است. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان می‌دهد که پراکندگی زیادی بین نمونه‌ها وجود دارد.

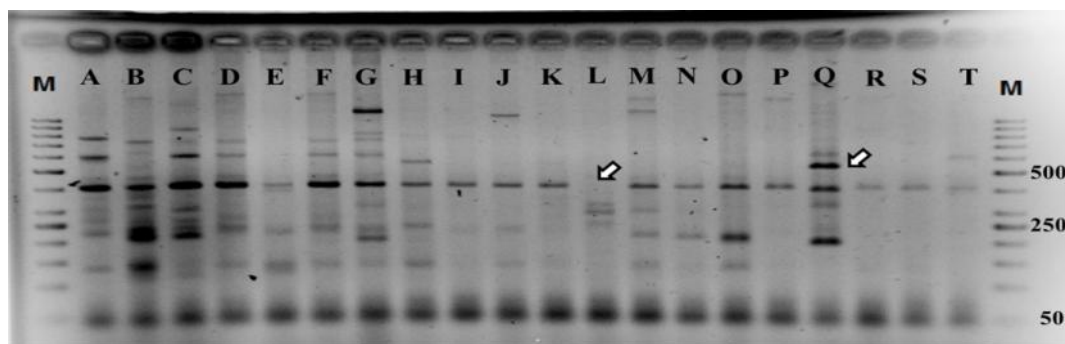
Figure 2. 3D plot of Principle Component Analysis (PCA). Letters A to T indicates the identification codes of 20 *A. littoralis* ecotypes, which are their complete descriptions was mentioned in Table 1. PCA shows that there is clear separation among samples.

ژنوم را مورد هدف قرار می‌دهند، در نتیجه استفاده از آن‌ها در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های با فواصل جغرافیایی دور و شرایط اقلیمی معنادار مفیدتر خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با پشتیبانی علمی و مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان انجام گردید. نویسندگان از آقایان مجتبی جهانی و مسعود حق پناه بخاطر همکاری در این مطالعه کمال تشکر را دارند.

در مجموع به نظر می‌رسد با توجه به سطح انتقال‌پذیری مطلوب بین جنس‌های تیره گرامینه، شناسایی و استفاده از نشانگرهای انتقال‌پذیر ریزماهواره EST می‌تواند راهکاری سریع و مقرون به صرفه برای ایجاد و توسعه نشانگرهای مبتنی بر DNA غیرتصادفی، در گونه‌های فاقد نشانگر باشد. همچنین نتایج بدست آمده در این تحقیق از قبیل میزان چندشکلی بالا، الگوی باندی واضح و تکرارپذیر نشان می‌دهد (شکل ۴) که می‌توان از این نشانگرها با دقت نسبتاً مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده نمود. البته بایستی توجه داشت چون عمدتاً این دسته از نشانگرها نواحی عملکردی



شکل ۳- الگوی باندی حاصل از نشانگر GTES6 بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در اکوتیپ‌های گیاه چمن شور ساحلی (از راست به چپ اکوتیپ A تا T)، M- نشانگر مولکولی ۵۰bp، پیکان‌های سفید به برخی تفاوت‌های منحصر بفرد در پروفیل تکثیر در اکوتیپ‌های Q و L اشاره می‌کند.

Figure 3. Amplicon profiles of GTES 6 marker in different ecotypes of *A. littoralis* on 2.5 % agarose gel, (From right to left ecotype A to T), M, 50bp ladder, white arrows refer to some unique differences between Q and L ecotypes PCR amplifying profiles.

منابع

- Babaian Jolodar, N.A., N. Mori and C. Nakamora. 2005. Transferability of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) microsatellite markers to hexaploid and tetraploid wheat species Iranian. *Journal of Agriculture*, 3: 219-227.
- Barhoumia, Z., W. Djebalib, A. Smaouic, W. Chai and C. Abdelly. 2007. Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus littoralis* (Willd) parl. *Journal of Plant Physiology*, 164: 842-850.
- Bassam, B., J.G. Caetano-Anolles and P.M. Gressho. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Journal of Analytical Biochemistry*, 19: 680-683.
- Chai, L., M.K. Biswas, H. Yi, W. Guo and X. Deng. 2013. Transferability, polymorphism and effectiveness for genetic mapping of the Pummelo (*Citrus grandis Osbeck*) EST-SSR markers. *Journal of Scientia Horticulturae*, 155: 85-91.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J. tickes. 1983. A Plant Molecular DNA Miniprepation version II, 1: 19-21.
- Hassani Tesie, S.F., H. Samizadeh Lahiji and M. Shoaie Deilami. Assessment of Genetic Diversity Among and Within Different Types of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Using IRAP and REMAP Markers. *Journal of Crop Breeding*, 7: 1-9.
- La-Rota, M., R.V. Kantety, J.K. Yu and M.E. Sorrells. 2005. Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice wheat and barley. *BMC Genom*, 6: 23-35.
- Li, G., W.H. Ra, J.W. Park, S.W. Kwon, J.H. Lee, C.B. Park and Y. Park. 2011. Developing EST-SSR markers to study molecular diversity in *Liriopeand Ophiopogon*. *Biochemical Systematics And Ecology*, 39: 241-252.
- Li, L., J. Wang, Y. Guo, F. Jiang, Y. Xu, Y. Wang, H. Pan, G. Han, R. Li and S. Li. 2008. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat. *Progress In Natural Science*, 18: 1485-1490.
- Li-Fang, Z., S. SLi-Xiao, F. Yi-Gao, Q. Bao-Li, X. Hai-Bin, P. Zi-You and Q. Zeng-Jun. 2008. Development and chromosome mapping of new wheat EST-SSR markers and application for characterizing rye chromosomes added in wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 34: 926-933.
- Liu, K and V. Muse. 2005. PowerMarker: Integrated analysis of genetic marker data. *Bioinformatics*, 21: 2128-2129.
- Ma, J.Q., C.L. Ma, M.Z. Yao, J.Q. Jin, Z.L. Wang, X.C. Wang and L. Chen. 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.
- Monica, A.M., R.K. Robert, C.U. Natalie and L.R. William. 2004. Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers. *Crop Science*, 44: 1236-1244.
- Sajjadi S.H. 2010. Assessment of genetic diversity of Iranian ecotype of *Aeluropus littoralis* plan using RAPD-PCR marker. M.Sc Thesis, Payam Noor University, Tehran, Iran. 200pp.
- Saramirad, B., M. Shokrpour, O. Sofalian, A. Pourmohammad and E. Esfandiari. Evaluation of Genetic Diversity of Wheat Genotypes by AFLP Markers. *Journal of Crop Breeding*, 7: 89-96.
- Sim, S.C., J.K. Yu, Y.K. Jo, M. Sorrells and G. Jung. 2009. Transferability of cereal EST-SSR markers to ryegrass. *Genome*, 52: 431-437.
- Torbatinejad, N., H. Maghsoodlowrad and A.M. Gharabash. 2000. Nutritive value of *Aeluropus littoralis* and *Aeluropus lagopoides* in sheep. *Journal Of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 7: 31-45.
- Ya-ming, G., X.U. Sheng-chun, M. Wei-hua, L. Ze-yun, H. Qi-zan, Z. Gu-wen and D. Ju. 2011. Genetic diversity analysis of Faba Bean (*Vicia faba* L.) based on EST-SSR markers. *Agricultural Sciences In China*, 10: 838-844.
- Zouari, N., R. BeenSaad, T. Leqarre, J. Azaza, X. Sabau, M. Jaoua, K. Masmoudi and A. Hassairi. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. *Gen*, 404: 61-69.

Assessment of Genetic Diversity in *Aeluropus Littoralis* using Transferable EST-Based Microsatellite Markers

Maryam Meidansari¹, Ghorbanali Nematzadeh², Najmeh Nasiri³ and Ehsan Shokri⁴

1, 2 and 3- M.Sc in plant biotechnology, Professors and PhD. in genetic engineering and molecular genetics, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

4- PhD in Nanobiotechnology Genetic & Agricultural Biotechnology of Tabarestan (GABIT), University of Agriculture Sciences and Natural Resources, (Corresponding author: e.shokri62@gmail.com)

Received: August 14, 2015

Accepted: February 6, 2016

Abstract

Aeluropus littoralis is one of the most successful monocot grasses in terms of high salinity tolerance, that contains forage quality and has valuable physiological features. The goal of this study is to introduce and provide quick access to DNA-based molecular markers for valuable halophyte, *Aeluropus littoralis* to assessment of genetic diversity. For this, a total number of 110 EST-SSR markers derived from wheat, rice and barley were amplified using *A.littoralis* genomic DNA to identify markers that were transferable. Accordingly, the total transferability of grass EST-SSR markers in *A.littoralis* was calculated about 44 %. This result showed that grass SSRs pool can be used easily for development of molecular markers in the valuable related species by spending less time and cost. Then, 12 pairs of transferable markers were used to evaluate the effectiveness of identifying markers in diversity assessment and genetic clustering of *A. littoralis* plants. Overall, 74 alleles of which over 90% were polymorphic were detected with an average of 6.1 alleles per marker. The polymorphism information content (PIC) values ranged from 0.26 to 0.38 with an average of 0.33. Cluster analysis using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA) and Dice's coefficient similarity grouped the *Aeluropus* ecotypes into seven groups. In this regard, ecotypes were rather separated in terms of geographical distances and the polymorphism among individuals and differences between groups was highly consistent with visual observations and variation of samples.

Keyword: *Aeluropus littoralis*, EST-SSR, Genetic diversity, Transferability