دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چمن‌شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انتقال‌پذیر مبتنی بر EST

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

۱، ۲ و 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 مسوول: e.shokri62@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۷

چکیده

گیاه چمن‌شور ساحلی یکی از موفق‌ترین گراس‌های تک‌لپه مطرح از نظر تحمل به شوری‌های زیاد است که ارزش علوفه‌ای 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 چمن‌شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*) می‌باشد. بدین منظور آزمون تکثیر ژنومی در این گیاه با استفاده از ۱۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره EST بدست آمده از گونه‌های گندم، برنج و جو برای شناسایی نشانگرهای انتقال‌پذیر انجام گرفت. بر این اساس میزان کل انتقال‌پذیری نشانگرهای ریزماهواره EST با منشاء غلات در گیاه چمن‌شور ساحلی ٤٤ درصد بدست آمد. این نتیجه نشان می‌دهد که از مخزن نشانگرهای ریزماهواره غلات می‌توان برای دستیابی و توسعه نشانگرهای مولکولی در سایر گونه‌های ارزشمند خویشاوند با صرف کمترین زمان و هزینه استفاده نمود. در ادامه به‌منظور بررسی میزان کارآمدی نشانگرهای انتقال‌پذیر شناسایی‌شده در ارزیابی سطح تنوع و گروه‌بندی ژنتیکی، از ۱۲ جفت نشانگر انتقال‌پذیر استفاده گردید. در مجموع ٧٤ مکان ژنی با میانگین ٦/١ آلل به ازای هر جفت آغازگر تکثیر شدند که بیش از ۹۰ درصد آن‌ها چندشکل بودند. شاخص PIC برای نشانگرهای مورد بررسی بین ۰/۲٦ و ۰/۳۸ با میانگین ۰/۳۳ محاسبه شد. در نهایت تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌های آلوروپوس را در ۷ گروه دسته‌بندی کرد. بر این اساس اکوتیپ ها ازلحاظ فاصله جغرافیایی نسبتاً از هم تفکیک شدند و میزان چند شکلی افراد و تفاوت گروه‌ها با مشاهدات ظاهری و تنوع کیفی بین نمونه ها مطابقت بالایی داشت.

واژه‌های کلیدی: انتقال‌پذیری، تنوع ژنتیکی، چمن شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*)، ریزماهواره EST

مقدمه

توالی‌های تکراری ساده (ریزماهواره) آرایشی از توالی‌های کوتاه ۱ تا ۶ جفت بازی هستند که سطح بالایی از چندشکلی طولی را نشان می‌دهند (۴،۸) و نسبت به سایر نشانگرهای مولکولی از مزایای بسیاری مثل توارث همبارز، تکثیر آسان و پوشش گسترده ژنوم برخوردار هستند. نشانگرهای ریز ماهواره به‌طور گسترده در تشخیص ژنی، ارزیابی تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های لینکاژی و انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS)[۱] به‌کار گرفته می‌شوند. با وجود مزایای فراوان، توسعه نشانگرهای ریزماهواره از روی DNA ژنومی فرآیندی زمان‌بر و پرهزینه است. اخیراً با توسعه ژنومیکس عملکردی تعداد زیادی از رکوردهای EST[۲] مربوط به گیاهان مختلف از جمله غلات در بانک ژن NCBI[۳] قرار گرفته که منبعی غنی برای استخراج ریزماهواره از EST می‌باشند (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 به‌دست می‌آیند. اگرچه EST اطلاعات ناقصی را تولید می‌کند، اما از این جهت که اطلاعات زیستی معنی‌داری را بوجود می‌آورد، ارزشمند است (۴). به علاوه ریزماهواره EST از نواحی رمزکننده ژن‌ها که در گونه‌های نزدیک بخوبی حفاظت شده‌اند، استخراج می‌شوند و به همین دلیل از یک گونه به گونه دیگر انتقال‌پذیری بالایی دارند و می‌توانند در نشانمند ساختن و نقشه‌یابی ژن‌ها مؤثرتر باشند (۱۲).

از آنجائی که ریزماهواره‌های EST از مناطق اگزونی بدست می‌آیند، معمولاً نسبت به ریزماهواره‌های ژنومی چندشکلی کمتری دارند اما چون چندشکلی بدست آمده از آن‌ها مربوط به ناحیه کدشونده ژنوم بوده و بازتابی از تنوع ژنتیکی قابل دستیابی در نواحی عملکردی ژنوم می‌باشد، می‌تواند اطلاعات اصلاحی مفیدی را فراهم کند (۱۰).

گیاه چمن‌شور ساحلی (*Aeluropus littoralis*) از هالوفیت‌های چندساله تک‌لپه‌ای متعلق به خانواده گندمیان بوده که می‌تواند در معرض شوری بالایی قرار گرفته و به‌طور 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 مدت‌ها پیش از جهت ارزش مرتعداری و ویژگی‌های 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 می‌باشد.

قابلیت تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره EST در گونه‌های نزدیک بهم اثبات شده است، لذا می‌توان به راحتی از آن‌ها در طبقه‌بندی انواع ژرم‌پلاسم‌های گونه‌های هم‌جنس استفاده نمود. چای و همکاران (۴) در تحقیقی تعداد ۲۱۲ نشانگر ریزماهواره EST مربوط به گیاه گریپ فروت چینی

1- Marker Assisted Selection 2- Expressed Sequence Tag 3- National Center for Biotechnology Information

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]

(*Pummelo*) به منظور بررسی انتقال‌پذیری 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 انتقال‌پذیر است. همچنین ۵۳ درصد از نشانگرها چندشکلی نشان داده و در نقشه‌یابی جمعیت به‌کار 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 ریزماهواره مورد استفاده قرار دادند. در مجموع، ۱۳۶۷ جفت آغازگر ریزماهواره EST طراحی شد که ۷۱۵ مورد آن بر روی گندم، برنج، ذرت، کتان و سویا، تحت شرایط PCR[1] مشابه بررسی شد و درجه انتقال‌پذیری در این ۵ گیاه به‌ترتیب ۶۹/۹۳، ۵۳/۵۷، ۶۳/۲۲، ۴۹/۹۳ و ۵۶/۲۷ درصد بدست آمد.

در مطالعه دیگری سیم و همکاران (۱۶) کاربرد ریزماهواره‌های EST غلات را در چاودار وحشی بررسی کردند. در مجموع تعداد ۱۶۵ نشانگر ریزماهواره EST غلات بررسی شد که درصد بالایی از انتقال‌پذیری (۵۷ درصد) و چندشکلی (۶۷ درصد) بدست آمد. این محققین گزارش کردند که ریزماهواره‌های EST به‌دست آمده انتقال‌پذیری بین‌گونه‌ای قابل‌توجهی را بین گونه‌های نزدیک به‌هم نشان دادند به‌طوری‌که درصد بالای انتقال‌پذیری ریزماهواره 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 ریزماهواره EST جدید را معرفی کردند. درنهایت، ۸۱ جایگاه تکثیر بوسیله ۴۳ نشانگر بر روی ۱۸ کروموزوم گندم نقشه‌یابی شدند. همچنین جایگاه کروموزومی تعدادی از این نشانگرهای ریزماهواره EST که انتقال‌پذیر بودند و جایگاه خاصی را در چاودار تکثیر کردند، روی کروموزوم‌های R, 4R, 5R و 7R چاودار با موفقیت نقشه‌یابی گردیدند. این نتایج به‌وضوح انتقال‌پذیری بالای شانگرهای EST–ریزماهواره را در بین جنس‌ها و گونه‌های نزدیک نشان می‌دهد. در مجموع با توجه به قیمت ارزان، سرعت توسعه و کارآمدی نشانگرهای ریزماهواره 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 انتقال‌پذیری، شناسایی نشانگرهای انتقال‌پذیر 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 چمن‌شور ساحلی می‌باشد که در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری (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 گردید. در جمع آوری 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 جمع آوری گردید.

جدول ۱– منشاء جغرافیایی (محل جمع آوری) 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– 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 خواف، 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،۲۰کیلومتری جاده خاکی درون کویر، رود خشک قندی	۵۱	۳۴	۱۰۱۴	O
سراب منطقه قشلاق حدود ۱۰ کیلومتری سراب	۴۷	۳۷	۱۶۵۸	P
جاده سرباز 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

1- Polymerase Change Reaction

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]

آزمون تکثیر و تعیین انتقال‌پذیری

مجموعه‌ای متشکل از ۱۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره EST با منشاء غلات شامل برنج، گندم و جو جهت بررسی میزان انتقال‌پذیری و آزمون تکثیر با استفاده از ژنوم گیاه چمن شور ساحلی انتخاب گردیدند. این مجموعه از آغازگرها قبلاً انتقال‌پذیری 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 پلیمراز بعنوان الگو استفاده شد. بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر نشانگر مولکولی ریزماهواره EST بر اساس روش Monica و همکاران (۱۳) با اندکی تغییر انجام شد.

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:CAAAGGAAGAGGCCCAGTC	R:GTAGTCCGGGAACTTGTCCA	۵۵
GTES ۲	(GGC)۵(CGG)۵	F:AACATCACCGTCAACGAGG	R:TAGGATAATTGGCCAGCGAG	۵۵
GTES ۳	(CCG)۸	F:GGCAACCTACTGCGCCTAC	R:ATTTACAACCTGCGGGTCAG	۵۵
GTES ٤	(CCT)٦	F:ACTCGAGAGAGGCTGACGAC	R:GTTCTTGCGGAACGACCTC	۵۵
GTES ٥	(CCCT)٦	F:CGACACAGACGAGAAAGCAA	R:GGAGCATCAAAATTGGAGGA	۵۵
GTES ٦	(AG)1١٤	F:AAAGATAAGCGGCGCTCTGC	R:CACCATGATGCAGTGAAGTC	۵٤
GTES ۷	(AGC)۵(AAC)١٤	F:GCAGCCGCAACCATTTCGAC	R:ACAATTCTCGCAGCAGTTGG	۵۸
GTES ۸	(AAC)۹	F:GACAACTGCCACATAGGAGG	R:TAACACCTGATGGGTGGAGG	۵٤
GTES ۹	(GG)۸	F:CCGGCCCGAGGAAAAGCT	R:GGCCGAAGAGGCGGTAGATCTT	٦۰
GTES ۱۰	(GGC)٤(GGC)۳	F:CGAGAAGAAGGTGGTGTCGT	R:AGGTCGTGGAAGGTCTTGG	۵۵
GTES ۱۱	(GAC)۷	F:CTACGGCATCAGGAAGCTC	R:CCATACACCGCATCTCTGTG	۵٤
GTES ۱۲	(CGG)۵	F:CCAAGAAGCGCAAGAAGC	R:CTGGAACTCCTCCGACTCCT	۵۵

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 سانتی گراد 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 باندی شفافی را روی ژل آگارز ارائه ندادند با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته ساز ۶ درصد تفکیک شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوهای نواری به‌صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (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 Pi و Pj به ترتیب فراوانی آلل‌های i و j در یک جایگاه ریزماهواره 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 کوفنتیک، 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.

به‌جز 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 باندی واضحی ایجاد کرد، بعنوان نشانگر قابل‌انتقال (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).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]

نتایج و بحث

ارزیابی انتقال‌پذیری و شناسایی نشانگرهای انتقال‌پذیر از گرامینه‌ها (برنج، گندم و جو) به گیاه چمن شور ساحلی

در این تحقیق میزان کل انتقال‌پذیری نشانگرهای ریزماهواره EST با منشاء غلات در گیاه چمن شور ساحلی ۴۴ درصد بدست آمد. همچنین مشخص گردید که بیشترین انتقال‌پذیری از ژنوم برنج به میزان ۴۰ درصد و کمترین انتقال‌پذیری از ژنوم جو به میزان ۲۷ درصد وجود دارد. در تأیید این نتایج می‌توان به گزارش زوآری و همکاران (۱۹) اشاره کرد که نشان دادند ۵۷ درصد از۴۹۲ کلون EST مورد مطالعه در این گیاه (چمن شور ساحلی)، همولوژی بالایی را با رکوردهای EST گیاه برنج دارد. نزدیکی و مشابهت در نواحی کدکننده ژنوم دو گیاه چمن شور ساحلی و برنج، امکان بهره‌مندی از رویکردهای ژنومیکس مقایسه‌ای برای درک سازمان ژنومی و عملکردی به‌منظور 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 آنجائی‌که 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 انتقال‌پذیر 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 انتقال‌پذیر 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	۰/۴۷	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

به‌منظور انتخاب نوع معیار فاصله یا ضریب تشابه مناسب، پس از بررسی ضریب همبستگی کوفنتیک 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. 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 رپید، ۵۰ درصد تنوع بین اکوتیپ‌های گیاه چمن شور ساحلی مشاهده کردند.

بطور کلی در مقایسه با سایر نشانگرهای غیر ژنی مثل ریزماهواره های ژنومی و رپید نشانگرهای ریزماهواره 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

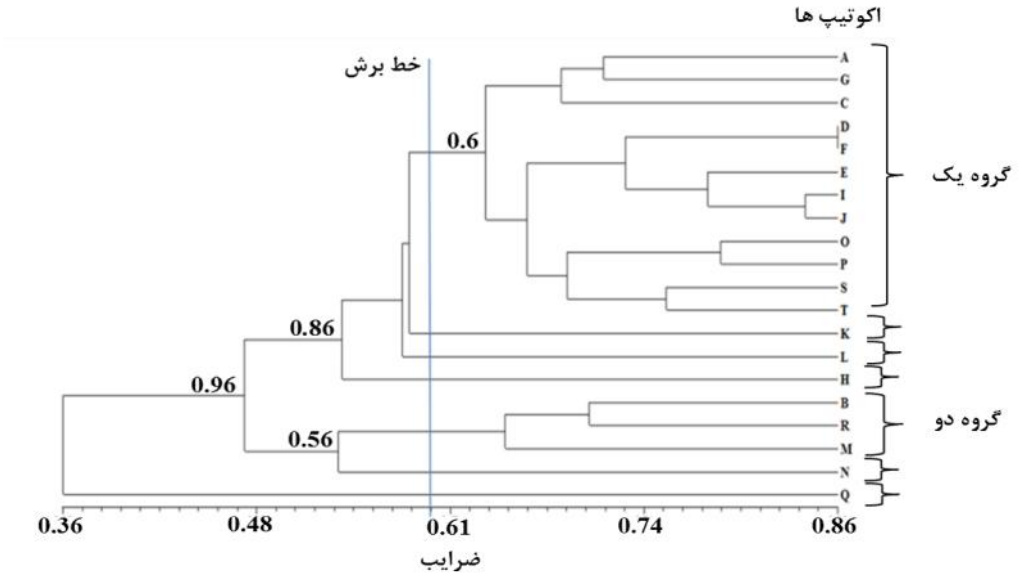
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]

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 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 موردبررسی 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 آلوروپوس به ذهن می‌رساند (شکل ۲).



شکل ۱- دندروگرام داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره‌EST با استفاده از روش (UPMGA). محل خط برش با درنظر گرفتن میانگین ضریب تشابه (۰/۵۹) 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 UPMGA 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

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. به‌نظر می‌رسد وجود اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مرکزی در اکثر گروه‌ها (بعنوان مثال اکوتیپ‌های D، F، J 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.

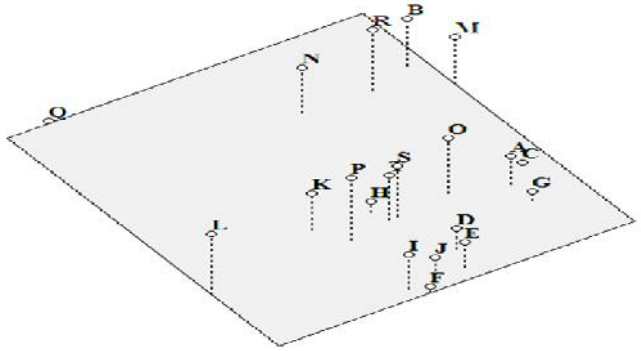
به‌طوری که طبق این نتایج (هم‌گروه شدن اکوتیپ‌های مرکزی با اکوتیپ‌های شمال‌غرب، مناطق شرقی و جنوبی، میانگین ضریب تشابه پایین بین اکوتیپ‌های مرکزی در مقایسه با نمونه‌های سایر مناطق و تنوع ظاهری مشاهده شده بین نمونه‌های مرکزی) احتمال می‌رود مرکز تنوع برای این گیاه در ایران، مناطق مرکزی بوده و از آنجا به سایر نقاط منتقل شده باشد. بطورکلی 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]
[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]

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 به‌تبع 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 مولفه‌های اصلی بعنوان مکمل 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.



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.

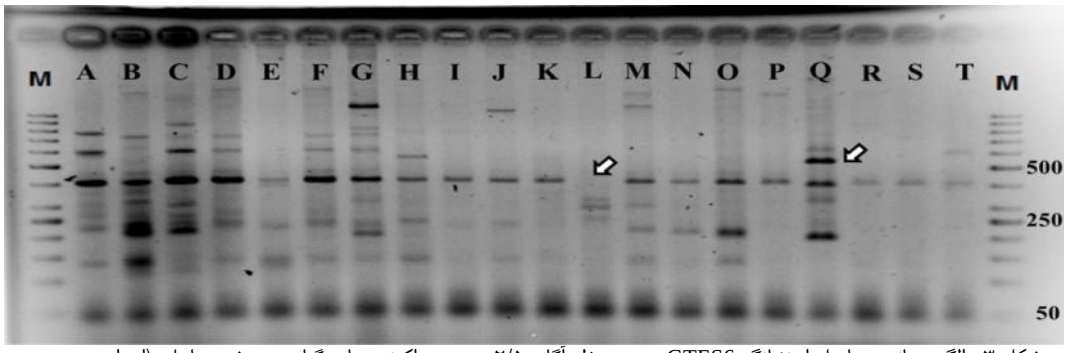
در مجموع به‌نظر می‌رسد با توجه به سطح انتقال‌پذیری مطلوب بین جنس‌های تیره گرامینه، شناسایی و استفاده از نشانگرهای انتقال‌پذیر ریزماهواره EST می‌تواند راهکاری سریع و مقرون به‌صرفه برای ایجاد و توسعه نشانگرهای مبتنی بر DNA غیرتصادفی، در گونه‌های فاقد نشانگر باشد. همچنین نتایج بدست آمده در این تحقیق از 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 ژنوم را مورد هدف قرار می‌دهند، درنتیجه استفاده از آن‌ها دربررسی 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]



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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Dellaporta, S.L., J. Wood and J. tickes. 1983. A Plant Molecular DNA Minipreparation version II, 1: 19-21.
6. Hassani Tesie, S.F., H. Samizadeh Lahiji and M. Shoaei 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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 speciesand their chromosome location on wheat. Progress In Natural Science, 18: 1485–1490.
10. 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.
11. Liu, K and V. Muse. 2005. PowerMarker: Integrated analysis of genetic marker data. Bioinformatics, 21: 2128-2129.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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 fabaL.*) based on EST-SSR markers . Agricultural Sciences In China, 10: 838-844.
19. 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 *Aleuropus littoralis*. Gen, 404: 61-69.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]

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

Maryam Meidansari[1], Ghorbanali Nematzadeh[2], Najmeh Nasiri[3] and Ehsan Shokri[4]

1, 2 and 3- M.Sc in plant biotechnology, Profeesore 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 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 were being transferable. Accordingly, the total transferability of gramineous EST-SSR markers in *A.littoralis* was calculated about 44 %. This result showed that gramineous 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.29252/jcb.9.22.23]