شناسایی نشانگرهای چندشکل ریزماهواره در چغندرقند

Development of polymorphic microsatellite markers for sugar beet (*Beta vulgaris* L.)

محمدحسین صفری[۱]، اصغر میرزایی اصل[۲*]، علی دلجو[۳] و فرشاد دشتی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱

م.ح. صفری، ا. میرزایی اصل، ع. دلجو و ف. دشتی. ۱۳۹۵. شناسایی نشانگرهای چندشکل ریزماهواره در چغندرقند. **چغندرقند، ۳۲(۲): ۱۷۳- ۱۸۲.**
DOI:10.22092/jsb.2016.107057

چکیده

به منظور شناسایی نشانگرهای SSR و EST-SSR در چغندرقند، مجموعاً ۲۸۸٤ توالی EST و همچنین توالی ژن FLC-Like، یکی از ژن‌های کلیدی کنترل کننده گلدهی در چغندر، از پایگاه NCBI استخراج شد. بعد از انجام سرهمبندی توالی‌ها و ساخت توالی‌های غیرتکراری، همه کانتیگ‌ها به منظور شناسایی SSRsهای دو تا شش نوکلئوتیدی مورد جستجو قرار گرفتند. سپس طراحی آغازگرهای اختصاصی از نواحی حفاظت شده اطراف این SSRها انجام شد. تعداد ۳۰۰ توالی معادل ١٤ درصد از کل توالی‌های EST دارای ریزماهواره بودند و به طور متوسط نواحی بیان شونده در چغندرقند به ازای هر ٤/٦ کیلو باز دارای یک ریزماهواره بوده و فراوانترین آن‌ها تکرارهای سه تایی (٣٦/٣٣) بودند. تعدا ۱۵ جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده بر روی ۱۲ رقم و لاین چغندر با آزمون PCR بررسی شد و شش نشانگر چندشکل شناسایی شد که چهار مورد از آن‌ها از توالی‌های ژن‌های کنترل کننده گلدهی هستند. این نشانگرها قادر به تولید دو تا چهار الل در هر مکان بوده و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) آن‌ها بین ٠/٤ تا ٠/٦٦ بود. این اطلاعات EST-SSR و نشانگرهای جدید SSR شناسایی شده، منابع مهمی برای مطالعات ژنتیکی، تاکسونومی، اصلاح مولکولی، شناسایی ارقام در مطالعات آینده بر روی چغندر قند است.

واژه های کلیدی: چغندرقند، ژن‌های گلدهی، نشانگر ریزماهواره، EST

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا-همدان، ایران.
۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا-همدان، ایران. *- نویسنده مسئول a.mirzaie@basu.ac.ir
۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا-همدان، ایران.
۴- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا-همدان، ایران.

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) گیاهی دگرگشن بوده (Marinus *et al*. 2010) و اهمیت اقتصادی آن در جهان به این علت است که این گیاه یکی از منابع عمده تولید ساکارز در جهان می‌باشد (Laurent *et al*. 2007). آگاهی یافتن از ساختار ژنتیکی جمعیت‌های زراعی و وحشی چغندر موجب شناخت بیشتر از ویژگی‌های تکاملی و اکولوژیکی این گیاه می‌شود. هم‌چنین این دانش به ارزیابی میزان خطر ناشی ازجریان ژنی بین محصولات تراریخت و گونه‌های خویشاوند وحشی آن‌ها که در سال‌های اخیر به شدت مورد توجه قرار گرفته است، کمک می‌کند (Cureton *et al*. 2002). استفاده از نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی تنوع ژنتیکی به ابزاری مهم برای مطالعات تکاملی و کشاورزی تبدیل شده است. این اطلاعات برای اصلاح محصولات و هم‌چنین شناسایی فرایندهای اهلی شدن گونه‌های وحشی استفاده می‌شود (Christopher *et al*. 2004). استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به‌دلیل چند شکل بودن آن‌ها حتی در بین افراد خویشاوند بسیار ایده‌ال است. ریزماهواره‌ها نوعی از توالی‌های تکراری هستند که در همه جای DNA حضور دارند. میزان فراوانی ریزماهواره‌ها به اندازه ژنوم و میزان DNA تکراری بستگی دارد اما در نواحی رونوشت‌برداری به‌ویژه رونوشت‌های غیرترجمه شونده، میزان فراوانی آن‌ها بیشتر است (Morgant *et al*. 2002). متاسفانه توسعه نشانگرهای جدید مبتنی بر توالی‌های ساده تکراری نیاز به هزینه و زمان زیادی دارد و این مشکل به همراه منابع کم آن‌هادر سطح جنس موجب کاهش اهمیت اقتصادی آن‌ها می‌شود. تاکنون مطالعات مختلفی به منظور شناسایی نشانگرهای SSR با روش‌هیبریداسیون در چغندر انجام گرفته است. در مطالعه رائی و همکاران (Rae *et al*. 2000) که به منظور یافتن نشانگرهای ریزماهواره به روش هیبریداسیون و مکان‌یابی آن‌ها در نقشه پیوستگی چغندر انجام شد، از مجموع ۳۴۰ کلون که از طریق هیبریدیزاسیون برای توالی‌یابی مناسب تشخیص داده شده بودند، ۶۴/۴ درصد آن‌ها برای طراحی آغازگر مناسب نبودند و از مجموع ۳۳/۶ درصد مناسب، تعداد ۱۱۴ جفت آغازگر طراحی کردند که در نهایت ۲۴ نشانگر چندشکل به دست آمد. کورتون و همکاران (Cureton *et al*. 2002) به منظور یافتن نشانگرهای ریزماهواره در چغندر به روش هیبریدیزاسیون از مجموع ۲۵۶ کلون که برای شناسایی کلون‌های دارای ریزماهواره مورد جستجو قرار گرفت، تعداد ۶۵ آغازگر از نواحی مجاور آن‌ها طراحی شد که در مجموع تنها نه جفت از آغازگر با باند مناسب به دست آمد و شش مورد آن‌ها چندشکل بودند. در مطالعه ریچارد و همکاران (Richard *et al*. 2004) از دو جمعیت چغندرهای زراعی و یک جمعیت از گونه‌های وحشی ماریتیما برای جستجوی ریزماهواره‌ها از روش هیبریدیزاسیون و الیگونوکلئوتیدهای تکراری$(CA)_{۱۵}$، $(GA)_{۱۵}$ و $(CT)_{۱۵}$ استفاده شد، که در مجموع هشت نشانگر چند شکل ریزماهواره با مجموع ۴۳ الل به دست آمد. تنوع الل‌ها در هر لوکوس بالا بود و از ۲ تا ۱۱ الل در هر لوکوس تولید شد که می‌تواند در محاسبه تنوع ژنتیکی و محل اهلی شدن آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. اسمالدرسو همکاران (Smulders *et al*. 2010) به منظور یافتن نشانگرهای ریزماهواره به روش هیبریدیزاسیون تعداد ۳۲۰۰ کلون برای یافتن توالی‌های تکراری جستجو کردند. تعداد ۳۱ کلون (یک درصد) شامل ریزماهواره‌های تترانوکلئوتیدی، ۲۴۰ کلون (۷/۷ درصد) تری‌نوکلئوتیدی و ۲۴۰ کلون (۷/۷ درصد) دی‌نوکلئوتیدی بودند. در این بین، مجموعاً از کلون‌های توالی یابی شده ۶۵ کلون به منظور طراحی آغازگر مناسب تشخیص داده شدند. از این مقدار ۲۵ جفت آغازگر چندشکل به دست آمدکه ۱۲ جفت آن‌ها دارای

چندشکلی بالایی بودند و برای بررسی واریته‌ها استفاده شدند. استفاده از این ۱۲ نشانگر چندشکل در ۳۰ گیاه دیپلوئید چغندرقند، ۳۸-۲۵ الل (متوسط ۳۲/۳ الل) و در گیاهان تریپلوئید ۴۶-۳۳ الل (متوسط ۳۹ الل) متفاوت تولید کردند. این ۱۲ نشانگر در هر مکان ۲۱-۲ الل متفاوت تولید کردند که این میزان در مقایسه با ۱۱-۲ الل گزارش شده توسط ریچارد و همکاران (2004) بیشترین میزان الل‌های متفاوت گزارش شده است.

یک روش برای کاهش هزینه و زمان شناسایی نشانگرهای ریزماهواره، استفاده از منابع ژنتیکی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی عمومی به منظور توسعه نشانگرهای ریزماهواره مبتنی بر ژن می باشد که این کار شانس قابلیت انتقال‌پذیری این نشانگرها را در بین جنس‌های نزدیک افزایش می‌دهد (Ellis and Burke 2007). در این میان یک راهکار جایگزین برای حل این مشکلات افزایش تعداد توالی‌های EST قابل دسترس در پایگاه‌های اطلاعاتی است (Laurent *et al.* 2007). پروژه‌های EST تعداد زیادی توالی با قابلیت دسترسی عمومی برای همه گیاهان تولید کرده که می‌توان از آن‌ها برای جستجوی ریزماهواره‌ها استفاده کرد. هم‌اکنون به دلیل در دسترس بودن منابع زیادی از توالی‌های EST برای گونه‌های مختلف گیاهی، جستجو در بین این توالی‌ها به منظور یافتن نشانگرهای ریزماهواره شدت یافته است. به عنوان مثال جستجو در ESTها برای شناسایی ریزماهواره‌ها در گیاهانی نظیر آرابیدوپسیس (Morgante *et al.* 2002)، کتان، گونه‌های مختلف یونجه (Eujay *et al.* 2004)، سویا و نیشکر (Cordeiro *et al.* 2001) و غلات شامل جو، ذرت و گندم (Gupta *et al.* 2003) انجام گرفته است. جستجو در بین۷۵/۲ مگاباز از توالی‌های جو، ۵۴/۷ مگاباز از توالی‌های ذرت، ۴۳/۹ مگاباز از توالی‌های برنج، ۳/۷ مگاباز توالی‌های چاودار، ۴۱/۶ مگاباز توالی‌های سورگوم و ۳۷/۵ مگاباز از توالی‌های گندم میزان فراوانی از نشانگرهای ریزماهواره را (به طور متوسط یک ریزماهواره در هر ۶ کیلوباز) نشان داده است. البته فراوانی‌های بیشتر از این نیز توسط مورگانت و همکارن (2002) گزارش شده است؛ به طوری که گزارش شده یک ریزماهواره به ازای هر ۱/۲ کیلو باز توالی‌های برنج، ۱/۱ کیلو باز توالی های ذرت و ۱/۳ کیلوباز از توالی‌های گندم حضور داشته است. میزان فراوانی کل برای حضور همه ریزماهواره‌ها با طول‌های متفاوت بستگی به پارامترهای مورد استفاده در جستجوی آن‌ها دارد. به همین دلیل مطالعات مختلف گزارشات متفاوتی از فراوانی حضور ریزماهواره‌ها در یک گونه گزارش کرده‌اند. برای مثال در گندم گزارشات مختلف مقادیر مختلفی از فراوانی حضور یک ریزماهواره به ازای ۰/۷۴ کیلوباز (Morgante *et al.* 2002)، ۱۷/۴۲ کیلوباز (Gao *et al.* 2003)، ۱ کیلوباز (Kantety *et al.* 2002) و ۹/۲ کیلوباز (Gupta *et al.* 2003) گزارش کرده‌اند.

توالی‌های EST چغندرقند اولین بار لائورنت و همکاران (2007) برای شناسایی نشانگرهای ریزماهواره استفاده شد. تعداد زیادی از نشانگرهای ریزماهواره‌ای EST و ژنومی را بر روی نقشه ژنتیکی چغندرقند مکان‌یابی کردند که اکثر آن‌ها از توالی‌های تکراری سه نوکلئوتیدی بودند. استفاده از این توالی‌های ریزماهواره به عنوان نشانگر مولکولی موجب کاهش هزینه توسعه نشانگرهای مولکولی می‌شود و از طرفی با توجه به این که از نواحی رونوشت برداری شده به دست آمده‌اند می‌توان با انجام همردیفی به عملکرد شناخته شده آن‌ها نیز پی برد (Varshney *et al.* 2005). با توجه به این که پس از سال ۲۰۰۷ توالی‌های EST چغندرقند زیادی در پایگاه داده GenBank گزارش شده است، هدف از انجام این تحقیق استفاده از توالی‌های جدید EST به منظور شناسایی نشانگرهای جدید

ریزماهواره برای توسعه نشانگرهای مولکولی و استفاده از آن‌ها برای انجام مطالعات بعدی بر روی چغندرقند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در ابتدا تعداد ۲۸۸۴ توالی EST چغندرقند از سال ۲۰۰۸ به بعد از پایگاه NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbest/) در یافت گردید. پس از سرهمبندی توالی‌های EST و ساخت کانتیگ‌های غیر تکراری این کانتیگ ها به منظور شناسایی توالی‌های SSR با استفاده از نرم‌افزار PHOBOS v.3.3.12 (Mayer 2010) مورد کاوش قرار گرفتند. پارامترهای مورد استفاده برای شناسایی ریزماهواره ها شامل شش تکرار برای توالی‌های تکراری دوتایی، پنج تکرار برای توالی‌های سه تایی، چهار تکرار برای توالی‌های چهارتایی و سه تکرار برای توالی‌های تکراری پنج و شش تایی در نظر گرفته شد که همه توالی‌های حاوی ریزماهواره دارای ناحیه حفاظت شده مجاور مناسبی برای طراحی آغازگر بودند. علاوه بر آن تعدادی از توالی‌های EST مرتبط با ژن‌های مسیرهای کنترل کننده گلدهی (Shojaei 2013) نیز برای شناسایی نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده قرار گرفتند و در نهایت پنج توالی از آن‌ها که حاوی ریزماهواره بودند برای طراحی آغازگر مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین توالی ژنومی ژن FLC-Like به عنوان یک ژن کلیدی کنترل کننده گلدهی در چغندر به شماره دستیابی EF036526.1 برای شناسایی ریزماهواره‌ها مورد استفاده قرار گرفت که در نهایت پنج توالی تکراری (ریزماهواره) از نواحی پروموتر و اینترون اول این ژن شناسایی شده و برای طراحی آغازگر مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل دو لاین و هشت رقم زراعی چغندرقند که در زمینه مقاومت به گلدهی با هم تفاوت داشتند. هم‌چنین دو نمونه چغندر ماریتیما (*Beta vulgaris spp maritima*) مورد استفاده قرار گرفتند. همه مواد گیاهی از موسسه تحقیقات چغندرقند تهیه گردید. ابتدا DNA ژنومی این نمونه‌ها با استفاده از CTAB استخراج شده (Cai *et al*. 1997).

برای طراحی آغازگرهای اختصاصی از نواحی حفاظت شده‌ی توالی‌های حاوی ریزماهواره از نرم‌افزار آنلاین primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3%20/primer3) استفاده شد. پارامترهای مورد استفاده برای طراحی آغازگر شامل: ۸۰-۲۰ درصد محتوای GC، دمای اتصال ۶۵-۵۵ در جه سانتی‌گراد، ۲۴-۱۸ نوکلئوتید طول آغازگر و ۳۵۰-۱۵۰ نوکلئوتید طول ناحیه تکثیر شونده بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ۲۵ میکرولیتر حجم نهایی به همراه 1x PCR buffer، 3mM $Mgcl_2$، 150 µm از هر dNTPs، 0.4 µm از هر کدام از آغازگرها، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و 50 ng از DNA الگو با استفاده از دستگاه ترموسایکلر T100 Bio-Rad به همراه برنامه دمایی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشته سازی اولیه، ۳۵ سیکل شامل۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، یک دقیقه دمای اتصال برای آغازگرها و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه و در پایان به مدت ۷ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول PCR بر روی ژل ۸ درصد غیر واسرشته ساز پلی‌اکریل آمید افقی (Safari and Mirzaie 2015) با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۴ تا ۵ ساعت جداسازی شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) به مدت ۱۵ دقیقه در زیر نور UV ظاهرسازی شد. پس از شناسایی نشانگرهای چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از رابطه $PIC=1-\sum(pi)^2$

(Gupta *et al*. 2003) محاسبه شد که در آن pi فراوانی الل iام می‌باشد

نتایج و بحث

از مجموع ۲۸۸۴ توالی EST دریافت شده از پایگاه NCBI، پس از سرهمبندی توالی‌ها، تعداد ۲۱۴۷ توالی غیرتکراری شامل ۴۷۵ کانتیگ و ۱۶۷۲ توالی انفرادی به دست آمد. به میزان ۵۷ درصد ار توالی‌ها غیرتکراری بوده و به صورت مستقل در قالب یک کانتیگ قرار گرفته‌اند و بقیه توالی‌ها با همدیگر یا مشابه و یا دارای ناحیه همپوشان با هم بودند. در مطالعه کونگ و همکاران (Kong *et al*. 2006) از مجموع ۵۲۶۷ توالی EST خیار، بعد از سر هم‌بندی تعداد ۳۵۵۸ توالی غیرتکراری، شامل ۷۱۴ کانتیگ و ۲۸۴۴ توالی منفرد به دست آمد. این میزان نیز نشان می‌دهد ۵۳ درصد از توالی‌های غیرتکراری به صورت منفرد بوده و بقیه آن‌ها به صورت کانتیگ بودند. هم‌چنین هو و همکاران (Hu et al. 2010) از سرهمبندی ۶۳۴۴ توالی EST خیار تعداد ۴۰۳۶ توالی غیرتکراری به دست آوردند. برای تعیین دقیق از فراوانی ریزماهواره‌ها، لازم است تا این توالی‌ها به صورت غیرتکراری در آمده و توالی‌های مشابه در آن حذف شود. در بین همه توالی‌های جستجو شده در این تحقیق، تعداد ۳۰۰ توالی داری ریزماهواره بوده‌اند که معادل ۱۴ درصد کل توالی‌های EST می‌باشد. این امر نشان دهنده این است که به طور متوسط نواحی بیان شونده در چغندر به ازای هر ۴/۶ کیلو باز دارای یک ریزماهواره هستند. فراوان‌ترین ریزماهواره‌های یافت شده، تکرارهای سه تایی بودند که مجموعاً ۳۶/۳۳ درصد کل ریزماهواره‌های یافت شده را به خود اختصاص دادند و بعد از آن تکرارهای دو، شش و پنج تایی به ترتیب با ۲۹، ۲۱ و ۱۰ درصد قرار داشتند و کمترین فراوانی متعلق به تکرارهای چهارتایی با ۳/۶۷ درصد از کل ریزماهواره‌های یافت شده بودند (شکل ۱).

در مطالعه لائورنت و همکاران (Laurent et al. 2007) بر روی چغندرقند چهار درصد کل ESTها حاوی توالی‌های ریزماهواره بوده‌اند. هو و همکاران (2010) گزارش کردند ۱۳ درصد از ESTهای خیار حاوی حداقل یک توالی ریزماهواره هستند. هم‌چنین در مطالعه دیگری از مجموع ۱۰۲۳۲ توالی EST متعلق به گیاه فلفل، ۱۲۰۱ مورد ریزماهواره یافت شد که به طور متوسط ۱۱ درصد از کل توالی‌ها حاوی ریزماهواره‌ها بوده‌اند (Yi *et al*. 2006). یکی از دلایل این امر، استفاده از برنامه‌های مختلف جستجوی ریزماهواره‌ها می‌باشد که هر کدام دارای پارامترهای مختلفی جهت جستجوی ریزماهواره‌ها هستند. اما در مجموع وقتی حداقل طول برای جستجوی ریزماهواره‌ها ۲۰ جفت باز درنظر گرفته شود، میزان فراوانی ریزماهواره‌ها، پنج درصد کل ESTها در گیاهان می‌باشد (Varshney *et al*. 2005).

گزارشات مختلف نشان داده است که تکرارهای سه نوکلئوتیدی (TNRs) بیشترین فراوانی را در بین ریزماهواره‌ها داشته و بعد از آن بیشترین فراوانی مربوط به تکرارهای دو نوکلئوتیدی (DNRs) و چهار نوکلئوتیدی (TTNRs) می‌باشد. در غلات تکرارهای سه نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی (۷۸-۵۴ درصد) ریزماهواره‌ها را به خود اختصاص داده و پس از آن تکرارهای دو نوکلئوتیدی (۴۰/۴-۱۷/۱ درصد) و چهار نوکلئوتیدی (۶-۳ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار دارند (Varshney *et al*. 2002). یی و همکاران (2006) گزارش کردند تکرارهای سه تایی و دو تایی به ترتیب با ۶۶ و ۱۸ درصد کل تکرارها بیشترین فراوانی و تکرارهای ۴ تایی با ۷/۷ درصد کمترین فراوانی را در ESTهای گیاه فلفل داشته‌اند. همچنین

لئورنت و همکاران (Yi *et al*. 2007) نیز گزارش کردند در چغندر بیشترین فراوانی متعلق به تکرارهای سه‌تایی (۴۷/۵ درصد) و بعد از آن متعلق به تکرارهای دو تایی (۳۲/۲ درصد) می‌باشد. از مجموع ۲۸۸۴ توالی EST چغندرقند، تعداد ۲۱۴۷ توالی غیرتکراری (معادل ۷۴ درصد کل ESTها) به دست آمد. بنابراین با توجه به اینکه امروزه بیش از ۳۰۰۰۰ توالی EST متعلق به چغندر قند در پایگاه ESTهای چغندرقند وجود دارد، احتمالا می‌توان از این میزان حدود ۲۲۲۰۰ توالی غیرتکراری به دست آورد. با توجه به این که حدود ۱۴ درصد از ESTها حاوی ریزماهواره هستند تقریبا می‌توان گفت بیش از ۳۰۰۰ توالی از این تعداد دارای ریزماهواره‌ها هستند

از توالی‌های EST-SSR شناسایی شده و توالی ژن FLC چغندرقند، تعداد ۱۵ جفت آغازگر طراحی شد که ۱۰ مورد از آن‌ها مربوط به توالی‌های EST و تعداد پنج مورد از ژن FLC بود. تعداد ۱۴ جفت از آغازگرها (۹۳ درصد) محصول PCR تولید کردند و بر روی ژل باند مربوطه مشاهده شد. تنها یک جفت از آغازگرها قادر به تولید محصول نبود که این امر ممکن است در اثر عواملی هم‌چون حذف ریزماهواره‌ها از یک مکان ژنی (Callen *et al*. 1993) و یا اشکال در سرهم‌بندی توالی‌ها و یا قرار گرفتن اینترون‌ها در جفت آغازگر طراحی شده باشد در مطالعه کونگ و همکاران (2006) از ۵۴ آغازگر طراحی شده پنـج جفـت از آغازگرها تولید محصول نکرده‌اند. لیو و همکاران (Liu 2010) گزارش کردند از ۲۸۶ جفت آغازگر طراحی شده در سویا تعداد ۱۲ جفت از آن‌ها هیچ گونه باندی تولید نکرده‌اند. هم‌چنین در گیاه فلفل از ۸۱۲ جفت آغازگر تنها ۵۱۳ آغازگر تولید بانـد کرده‌اند که این مقدار برابر با ۶۳/۱ درصد آغازگرها بوده اسـت و حدود ۳۶ درصد از آغازگرها قادر به تولید باند نبوده‌اند (Yi *et al*. 2006).

جدول ۱ مشخصات نشانگرهای چندشکل ریزماهواره‌ای به دست آمده از چغندرقند

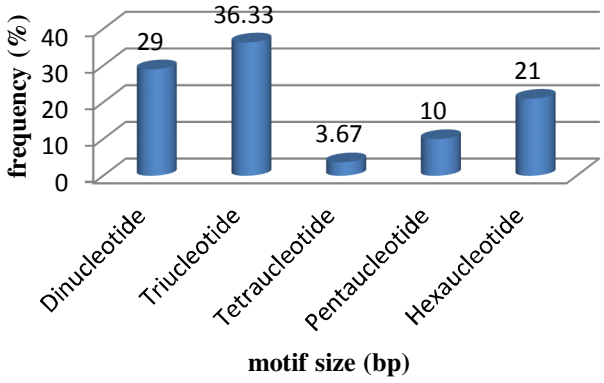
نشانگر	شماره دستیابی	موتیف	PIC	سایز	آغازگر	ژن مرتبط
EST981	FG344863.1	$(TAA)_{10}$	0.58	228	F:CCAAACAAACCCCAAATCAT R:AATTGTCGTCCAGGTGCTTC	نامشخص
EST1653	HS075615.1	$(AT)_{23}$ $(AC)_6$	0.66	209	F:TCATTTTAACACTTCAATCATCCA R:TGATCAGGAGTTTGTGAAGGAA	نامشخص
EST1	BI096002.1	$(GAA)_{13}$	0.48	189	F:GCAAAAACCCAAAACCCTTT R:CGGAAATCGATACGGTTCAT	TOC1 (*Arabidopsis taliana*)
EST30	HS075595.1	$(AAT)_5$	0.4	227	F:TTTCTCTTGTTTATTTTTCCCTTG R:CCTGATTTCCTGCTTTCTGC	Dof2 (*Lycopersiconesculentum*)
EST52	BQ591620.	$(TTCAA)_3$ $(GAA)_4$	0.44	278	F:CATCAGCAGAAATTCCATCG R:CTCATCGTCAAATTCTCTATCG	SUF4 (*Beta vulgaris*)
FLC744	EF036526.1	$(TTA)_5$ $(TAT)_4$	0.37	278	F:TGCTCCCTCAATCTTATTGGTT R:TGGGGTTTGCAATAGTTTATCC	FLC-Like

در کل، از ۱۴ جفت آغازگر تولید کننده محصول، تعداد ۶ جفت از آغازگرها چندشکلی داشته‌اند که نشان دهنده ۴۲ درصد چندشکلی برای همه آغازگرها می‌باشد (جدول ۱).در استفاده از نشانگرهای EST-SSR الل‌های بی‌اثر نیز دیده می‌شود. الل

بی‌اثر یا صفر به اللی گفته می‌شود که در بین افراد مختلف در سطح ژل چندشکلی نشان ندهد. الل‌های بی‌اثر در مطالعه بر روی گونه‌های مختلفی ازجمله کیوی، برنج، کاج و گندم (Eujay *et al*. 2001) گزارش شده است. در گندم مشاهده الل‌های بی‌اثر رایج بوده و بر روی ریزماهواره‌های ژنومی نیز گزارش شده است (Gupta *et al*. 2003). به وجود آمدن الل‌های بی‌اثر می‌تواند در اثر عواملی همچون حذف ریزماهواره‌ها از یک مکان ژنی باشد. (Callen *et al*. 1993)

از مجموع ۱۰ جفت آغازگر طراحی شده بر اساس ریزماهواره‌های موجود در توالی‌های EST که بیشتر آنها از توالی‌های EST ژن‌های مسیرهای کنترل کننده گلدهی (Shojaei 2013) بودند، در نهایت پنج جفت آغازگر چندشکلی نشان دادند (شکل ۲). پنج جفت آغازگر با تولید دو تا چهار الل در هر مکان و شاخص PIC بین ۰/۴ تا ۰/۶۶ چندشکل بودند. در مطالعه لئورنت و همکاران (2007) بر روی چغندرقند میزان چندشکلی برای EST-SSRها ۴۷/۸ درصد بوده در حالی که بیشترین مقدار آن در ریزماهواره‌های ژنومی ۶۱/۵ بوده است. اسمالدرس و همکاران (2010) از ۶۵ جفت آغازگر توسعه‌یافته به روش هیبریداسیون ۲۵ جفت آغازگر چندشکل به دست آوردند. گزارش شده است ۲۹/۲ درصد از آغازگرهای توسعه یافته از ESTهای خیار چندشکلی نشان می‌دهند (Yi *et al*. 2006). لیو و همکاران (2010) گزارش کردند ۱۷/۷ درصد از آغازگرهای طراحی شده از ESTهای سویا چند شکل بوده و در هر لوکوس ۲ تا ۸ الل تولید می‌کند. آن‌ها هم‌چنین گزارش کردند شاخص PIC برای این نشانگرها ۰/۱۹۴ تا ۰/۷۹۴ بوده است.

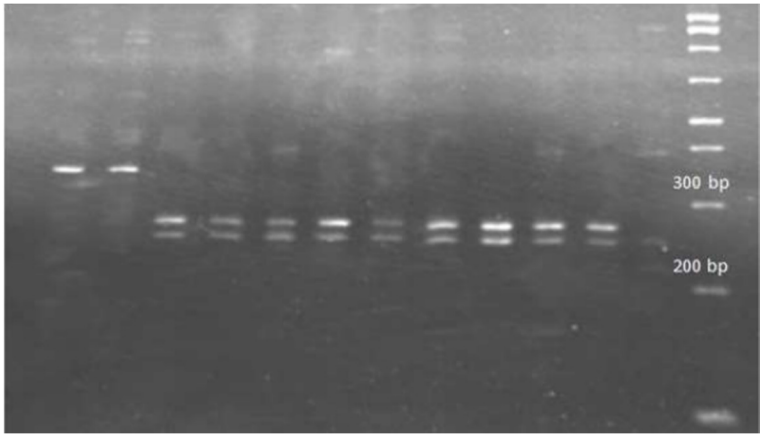
هم‌چنین نتایج همردیفی (BLAST) توالی‌های نشانگرهای چندشکل نشان داد که برخی از این نشانگرها از ESTهایی به دست آمده‌اند که دارای شباهت معنی‌داری به ژن‌های شناخته شده هستند. نشانگر EST1 به ژن *REF6* به عنوان یکی از ژن‌های درگیر در مسیر فتوپریود گلدهی، شباهت معنی‌داری با ارزش مورد انتظار (E-value) برابر با 3e-12 دارد. نشانگر EST30 با ژن *CDF1 (AT5G62430)* شباهت معنی‌داری داشته و ارزش مورد انتظار برای این همردیفی برابر 6e-24 می‌باشد. این ژن یک دومین انگشت-روی به نام Dof دارد که با اتصال به ژن کلیدی مسیر فتوپریودی CO موجب کنترل زمان گلدهی می‌شود. همچنین نشانگر EST52 شباهت معنی‌داری با ارزش مورد انتظار 2e-55 با ژن *SUF4(AT1G30970)* دارد. این ژن در مسیر ورنالیزاسیون گلدهی فعال بوده و پروتئین آن در تاخیر فرایند گلدهی نقش دارد (Shojaei 2013).



شکل ۱ فراوانی تعداد ریزماهواره‌ها بر اساس اندازه واحد تکراری (موتیف)

از پنج جفت آغازگر طراحی شده بر اساس ریزماهواره‌های شناسایی شده از ناحیه پروموتر و اینترونی ژن *FLC*-Like چغندرقند، آغازگر FLC744 از ناحیه اینترون اول این ژن چندشکل بود. این نشانگر دو الل نشان داد. اثر اصلی ورنالیزاسیون

در گلدهی گیاه آرابیدوپسیس یکساله زمستانه، متوقف کردن بیان ژن *FLC* از طریق تغییر ساختار کروماتین *FLC* است. در طی ورنالیزاسیون ژن کلیدی FLC متحمل تغییرات متیلاسیونی در هیستون می‌شود. بیان *FLC* که به شدت با اعمال دوره سرما سرکوب می‌شود، مستقیماً به عنوان مانع تنظیم کننده‌های گلدهی FT، SOC1 بوده و از انتقال به گلدهی جلوگیری می‌کند (Helliwell *et al*. 2006; Crevillen *et al*. 2011). در طی فرایند ورنالیزاسیون گیاه آرابیدوپسیس، دو پروتئین ژن‌های *VRN1* و *VRN2* برای افزایش هیستون۳ لیزین۹ در ناحیه پروموتور ژن FLC نیاز است (Bastow *et al*. 2004). پروتئین *VRN1* نسبت به *VRN2* اهمیت بیشتری برای تغییر در ناحیه اینترون۱ ژن *FLC* دارد، در حالی که *VRN2* برای متیله شدن هیستون ۳ لیزین ۲۷در ناحیه پروموتور ژن *FLC* کافی است (Bastow *et al*. 2004). با توجه به اهمیت ژن *FLC*، در این تحقیق توالی‌های SSR پروموتر و اینترون ۱ ژن *FLC* چغندرقند بررسی گردید و نشانگر FLC744 معرفی گردید.



شکل ۲ نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل ۸ درصد پلی اکریل آمید به همراه نشانگر مولکولیbp ۱۰۰

در این تحقیق بیش از ۳۰۰ توالی دارای ریزماهواره شناسایی شد و از نواحی حفاظت شده آن‌ها آغازگرهای اختصاصی طراحی گردید. با شناسایی توالی‌های ریزماهواره چندشکل در بین آن‌ها می‌توان نشانگرهای ریزماهواره متعددی معرفی کرد که در تهیه نقشه ژنتیکی گیاه چغندرقند استفاده کرد و یا برای آنالیز ژنتیکی چغندرقند و همچنین گونه‌ها و جنس‌های نزدیک به‌کار برد. هم‌چنین شش نشاگر ریزماهواره جدید چندشکل نیز برای چغندر معرفی شد که چهار مورد از این نشانگرها از توالی ژن‌های کنترل کننده گلدهی است. این نشانگرها ممکن است با صفت یا صفت‌های گلدهی مرتبط باشند و یا با سایر صفت چغندرقند که ژن‌های آن‌ها در مجاورت آنها است، پیوستگی داشته باشند و می‌تواند در مطالعات آینده بر روی چغندرقند مورد استفاده قرار گیرد.

Reference: منابع مورد استفاده:

Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature. 2004; 427: 164-167.

Cai D, Kleine M, Kifle S, Horloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Lankhorst RMK, Salentijn EMJ, Lange W, Stiekema WJ, Wyss V, Grundler FMW, Jung C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science. 1997; 275: 832-834.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR. Incidence and origin of null alleles in the (AC)n microsatellite markers. American Journal of Human Genetics. 1993; 52: 922–927.

Christopher MR, Mary B, Sharon EM, Steve K, Lee P. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (Beta vulgaris). Mol. Ecol. Not. 2004; 4:243-245.

Cordeiro GM, Casu R, Mcintyre Cl, Manners JM, Henry RJ. Microsatellite markers from sugar cane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. Plant Science. 2001; 160: 1115-1123.

Crevillen P, Dean C. Regulation of the floral repressor gene FLC: the complexity of transcription in a chromatin context. Current opinion in plant biology. 2011;14: 38-44.

Cureton AN, Burns MJ, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ. Development of simple sequence repeat (SSR) markersfor the assessment of gene flow between sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) populations. Mol. Ecol. Not. 2002; 2: 402-403.

Ellis JR, Burke JM. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. Heredity. 2007; 99: 125-132.

Eujay I, Sledge Mk, Wang L, May GD, Chekhovskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR. Medicago truncatula EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. Theoretical and Applied Genetics. 2004; 108: 414-422.

Eujay I, Sorells M, Baum M, Wolters P, Powll. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. Euphytica. 2001; 119: 39–43.

Gao LF, Tang J, Li H, Jia J. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. Molecular Breeding. 2003; 12: 245–261.

Gupta PK, Rustgim S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Molecular Genetics and Genomics. 2003; 270: 315–323.

Helliwell CA, Wood CC, Robertson M, James Peacock W, Dennis ES. The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. The Plant Journal. 2006; 46: 183-192.

Hu J, Li J, Liang F, Liu L, Si S. Genetic relationship of a cucumber germplasm collection revealed by newly developed EST-SSR markers. Journal of Genetics. 2010; 89: 28-32.

Kantety RV, Rota ML, Matthews DE, Sorrells. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. Plant Molecular Biology. 2002; 48: 501–510.

Kong Q, Xiang C, Yu Z. Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database. Molecular Ecology notes. 2006; 6, 1234-1236.

Laurent V, Devaux P, Thiel F, Mielordt S, Touzet P, Quillet MC. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome.Theor Appl Genet. 2007; 115: 793-805.

Liu Y, Li Y, Zhou G, Uzokwe N, Chang R, Chen S, Qiu L. Development of Soybean EST-SSR Markers and Their Use to Assess Genet Diversity in the Subgenus Soja. Agricultural sciences in china. 2010; 9(10), 1423-1429.

Marinus JMS, Esselink GD, Everaert I, Riek JD, Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *Vulgaris*) varieties using microsatellite markers. BMC Genetics. 2010; 11(41): 1-11.

Mayer C. Phobos a tandem repeat search program. IOP Publishing PHOBOS. 2010; http://www.ruhr-uni-bochum.de/ecoevo/cm/cm_phobos.htm

Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. Nat Genet. 2002; 30(2): 194-200.

Rae SJ, Aldam C, Dominguez I., Barnes SR, Edwards KJ. Development and incorporation of microsatellite markersinto the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* spp.). Theoretical and Applied Genetics. 2000; 100: 1240-1248.

Richard CM, Brownson M, Mitchell SE, Kresovich S, Panella L. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). Molecular Ecology Notes. 2004; 4: 243-245.

Safari MH, Mirzaie-asl A. Horizontal Poly-acrylamide Gel Electrophoresis by Agarose Slots. Agricultural biotechnology. 2015; 33-37. (In Persian, abstract in English)

Shojaei E. study of some flowering controlling genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Msc Thesis. University of Bu-Ali Sina. 2013. (In Persian, abstract in English)

Smulders MJM, Esselink GD, Everaert I, Riek JD, Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp.*vulgaris*) varieties using microsatellite markers. BMC Genetics. 2010; 11: 41

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in biotechnology. 2005; 23(1): 48-55.

Yi G, Lee J, Lee S, Choi D, Kim BD. Exploitation of pepper EST–SSRs and an SSR-base linkage map. Theoretical and Applied Genetics. 2006; 114: 113-130.