

شناسایی نشانگرهای چندشکل ریزماهوره در چغندر قند

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 ریزماهوره در چغندر قند. چغندر قند، ۳۲(۲): ۱۷۳-۱۸۲

چکیده

به منظور شناسایی نشانگرهای SSR و EST-SSR در چغندر قند، مجموعاً ۲۸۸۴ 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 غیر تکراری، همه کانتیگ‌ها به منظور شناسایی SSRهای 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 ۱۴ درصد از کل توالی‌های EST دارای ریزماهوره بودند و به طور متوسط نواحی بیان شونده در چغندر قند به ازای هر ۴/۶ کیلو باز دارای یک ریزماهوره بوده و فراوانترین آن‌ها تکرارهای سه تایی (۳۶/۳۳) بودند. تعداد 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 آلل در هر مکان بوده و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) آن‌ها بین ۰/۴ تا ۰/۶۶ 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.

واژه‌های کلیدی: چغندر قند، ژن‌های گلدهی، نشانگر ریزماهوره، 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

هیبریداسیون و مکان‌یابی آن‌ها در نقشه پیوستگی چغندر انجام شد، از مجموع ۳۴۰ کلون که از طریق هیبریداسیون 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 هیبریداسیون 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 چغندره‌های زراعی و یک جمعیت از گونه‌های وحشی ماریتیمای برای جستجوی ریزماهواره‌ها از روش هیبریداسیون و الیگونوکلئوتیدهای تکراری_{۱۵}(CA)،_{۱۵}(GA) و _{۱۵}(CT) استفاده شد، که در مجموع هشت نشانگر چند شکل ریزماهواره با مجموع ۴۳ الیل به دست آمد. تنوع الیل‌ها در هر لوکوس بالا بود و از ۲ تا ۱۱ الیل 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 هیبریداسیون 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 توالی‌یابی شده ۶۵ کلون به منظور طراحی آغازگر مناسب تشخیص داده شدند. از این مقدار ۲۵ جفت آغازگر چندشکل به دست آمد که ۱۲ جفت آن‌ها دارای

چغندرقد (*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 از جریان 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 به دلیل چند شکل بودن آن‌ها حتی در بین افراد خویشاوند بسیار ایده‌آل 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). متأسفانه توسعه نشانگرهای جدید مبتنی بر توالی‌های ساده تکراری نیاز به هزینه و زمان زیادی دارد و این مشکل به همراه منابع کم آن‌ها در سطح جنس موجب کاهش اهمیت اقتصادی آن‌ها می‌شود. تاکنون مطالعات مختلفی به منظور شناسایی نشانگرهای SSR با روش هیبریداسیون در چغندر انجام گرفته است. در مطالعه رائی و همکاران (Rae *et al.* 2000) که به منظور یافتن نشانگرهای ریزماهواره به روش

مگاباز توالی‌های سورگوم و ۳۷/۵ مگاباز از توالی‌های گندم میزان فراوانی از نشانگرهای ریزماهوره را (به طور متوسط یک ریزماهوره در هر ۶ کیلوباز) نشان داده است. البته فراوانی‌های بیشتر از این نیز توسط مورگان و همکاران (2002) گزارش شده است؛ به طوری که گزارش شده یک ریزماهوره به ازای هر ۱/۲ کیلو باز توالی‌های برنج، ۱/۱ کیلو باز توالی‌های ذرت و ۱/۳ کیلوباز از توالی‌های گندم حضور داشته است. میزان فراوانی کل برای حضور همه ریزماهوره‌ها با طول‌های متفاوت بستگی به پارامترهای مورد استفاده در جستجوی آن‌ها دارد. به همین دلیل مطالعات مختلف گزارشات متفاوتی از فراوانی حضور ریزماهوره‌ها در یک گونه گزارش کرده‌اند. برای مثال در گندم گزارشات مختلف مقادیر مختلفی از فراوانی حضور یک ریزماهوره 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 چغندر قند اولین بار لائورنت و همکاران (2007) برای شناسایی نشانگرهای ریزماهوره استفاده شد. تعداد زیادی از نشانگرهای ریزماهوره‌ای EST و ژنومی را بر روی نقشه ژنتیکی چغندر قند مکان‌یابی کردند که اکثر آن‌ها از توالی‌های تکراری سه نوکلئوتیدی بودند. استفاده از این توالی‌های ریزماهوره 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 چغندر قند زیادی در پایگاه داده GenBank گزارش شده است، هدف از انجام این تحقیق استفاده از توالی‌های جدید EST به منظور شناسایی نشانگرهای جدید

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

یک روش برای کاهش هزینه و زمان شناسایی نشانگرهای ریزماهوره، استفاده از منابع ژنتیکی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی عمومی به منظور توسعه نشانگرهای ریزماهوره 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 دسترس عمومی برای همه گیاهان تولید کرده که می‌توان از آن‌ها برای جستجوی ریزماهوره‌ها 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 ریزماهوره شدت یافته است. به عنوان مثال جستجو در ESTها برای شناسایی ریزماهوره‌ها در گیاهانی نظیر آرایدوپسیس (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 بین ۷۵/۲ مگاباز از توالی‌های جو، ۵۴/۷ مگاباز از توالی‌های ذرت، ۴۳/۹ مگاباز از توالی‌های برنج، ۳/۷ مگاباز توالی‌های چاودار، ۴۱/۶

هم تفاوت داشتند. هم‌چنین دو نمونه چغندر ماریتیمما (*Beta vulgaris spp maritima*) مورد استفاده قرار گرفتند. همه مواد گیاهی از موسسه تحقیقات چغندرقد 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 درجه سانتی‌گراد، ۲۴-۱۸ نوکلئوتید طول آغازگر و ۳۵۰-۱۵۰ نوکلئوتید طول ناحیه تکثیر شونده بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ۲۵ میکرولیتر حجم نهایی به همراه ۱x PCR buffer، ۳mM MgCl₂، 150 μm از هر Taq 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 شامل ۹۴ 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 $PIC=1-\sum(\pi_i)^2$

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

مواد و روش‌ها

در ابتدا تعداد ۲۸۸۴ توالی EST چغندرقد از سال ۲۰۰۸ به بعد از پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbest/>) دریافت گردید. پس از سرهمبندی توالی‌های EST و ساخت کانتیگ‌های غیر تکراری این کانتیگ‌ها 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 ریزماهواره‌ها 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 پروموتور 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 چغندرقد که در زمینه مقاومت به گلدهی با

چهارتایی با ۳/۶۷ درصد از کل ریزماهوره‌های یافت شده بودند (شکل ۱).

در مطالعه لائورنت و همکاران (Laurent et al. 2007) بر روی چغندر قند چهار درصد کل ESTها حاوی توالی‌های ریزماهوره بوده‌اند. هو و همکاران (2010) گزارش کردند ۱۳ درصد از ESTهای خیار حاوی حداقل یک توالی ریزماهوره هستند. همچنین در مطالعه دیگری از مجموع ۱۰۲۳۲ توالی EST متعلق به گیاه فلفل، ۱۲۰۱ مورد ریزماهوره یافت شد که به طور متوسط ۱۱ درصد از کل توالی‌ها حاوی ریزماهوره‌ها بوده‌اند (Yi et al. 2006). یکی از دلایل این امر، استفاده از برنامه‌های مختلف جستجوی ریزماهوره‌ها می‌باشد که هر کدام دارای پارامترهای مختلفی جهت جستجوی ریزماهوره‌ها هستند. اما در مجموع وقتی حداقل طول برای جستجوی ریزماهوره‌ها ۲۰ جفت باز در نظر گرفته شود، میزان فراوانی ریزماهوره‌ها، 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 ریزماهوره‌ها 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) ریزماهوره‌ها را به خود اختصاص داده و پس از آن تکرارهای دو نوکلئوتیدی (۴۰/۴-۱۷/۱ درصد) و چهار نوکلئوتیدی (۳-۶ 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

(Gupta et al. 2003) محاسبه شد که در آن pi فراوانی الل نام 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 از 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 سرهمبندی 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 ریزماهوره‌ها، 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 دارای ریزماهوره 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 ریزماهوره هستند. فراوانترین ریزماهوره‌های یافت شده، تکرارهای سه تایی بودند که مجموعاً ۳۶/۳۳ درصد کل ریزماهوره‌های 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

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 ریزماهوره‌ها 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 پنج جفت 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 باند کرده‌اند که این مقدار برابر با ۶۳/۱ درصد آغازگرها بوده است و حدود ۳۶ درصد از آغازگرها قادر به تولید باند نبوده‌اند (Yi *et al.* 2006).

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 چغندرقتند، 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 چغندرقتند وجود دارد، احتمالاً می‌توان از این میزان حدود ۲۲۲۰۰ توالی غیرتکراری به دست آورد. با توجه به این که حدود ۱۴ درصد از ESTها حاوی ریزماهوره هستند تقریباً می‌توان گفت بیش از ۳۰۰۰ توالی از این تعداد دارای ریزماهوره‌ها هستند از توالی‌های EST-SSR شناسایی شده و توالی ژن FLC چغندرقتند، تعداد ۱۵ جفت آغازگر طراحی شد که ۱۰ مورد از آن‌ها مربوط به توالی‌های EST و تعداد پنج مورد از ژن FLC

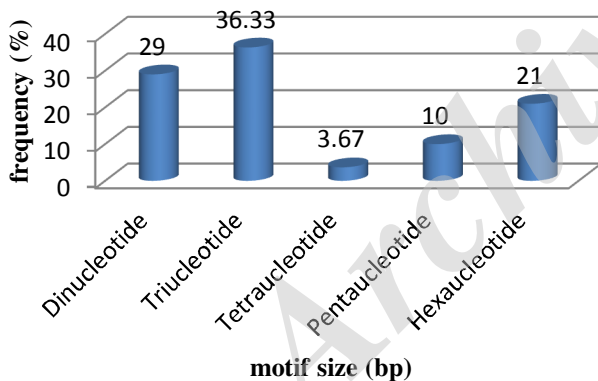
جدول ۱ مشخصات نشانگرهای چندشکل ریزماهوره‌ای به دست آمده از چغندرقتند

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:TCATTTTAACTTCAATCATCCA R:TGATCAGGAGTTTGTGAAGGAA	نامشخص
EST1	BI096002.1	(GAA) ₁₃	0.48	189	F:GCAAAAACCCAAAACCCTTT R:CGGAAATCGATACGGTTCAT	TOC1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
EST30	HS075595.1	(AAT) ₅	0.4	227	F:TTTCTCTGTTTATTTTCCCTTG R:CCTGATTCCTGCTTTCTGC	Dof2 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
EST52	BQ591620.	(TTCAA) ₃ (GAA) ₄	0.44	278	F:CATCAGCAGAAATTCATCG R:CTCATCGTCAAATCTCTATCG	SUF4 (<i>Beta vulgaris</i>)
FLC744	EF036526.1	(TTA) ₅ (TAT) ₄	0.37	278	F:TGCTCCCTCAATCTTATTGGTT R:TGGGGTTTGCAATAGTTTATCC	FLC-Like

چندشکلی برای همه آغازگرها می‌باشد (جدول ۱). در استفاده از نشانگرهای EST-SSR ال‌های بی‌اثر نیز دیده می‌شود. ال

در کل، از ۱۴ جفت آغازگر تولید کننده محصول، تعداد ۶ جفت از آغازگرها چندشکلی داشته‌اند که نشان دهنده ۴۲ درصد

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 ریزماهورها بر اساس اندازه واحد تکراری (موتیف)

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

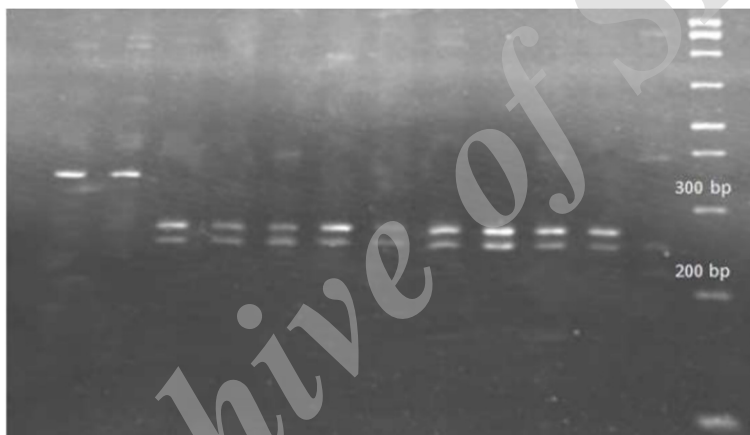
بی‌اثر یا صفر به الی گفته می‌شود که در بین افراد مختلف در سطح ژل چندشکلی نشان ندهد. ال‌های بی‌اثر در مطالعه بر روی گونه‌های مختلفی از جمله کیوی، برنج، کاج و گندم (Eujay *et al.* 2001) گزارش شده است. در گندم مشاهده ال‌های بی‌اثر رایج بوده و بر روی ریزماهورهای ژنومی نیز گزارش شده است (Gupta *et al.* 2003).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

از مجموع ۱۰ جفت آغازگر طراحی شده بر اساس ریزماهورهای 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 ال در هر مکان و شاخص PIC بین $0/4$ تا $0/66$ چندشکل بودند. در مطالعه لئورنت و همکاران (2007) بر روی چغندر قند میزان چندشکلی برای EST-SSRها $47/8$ درصد بوده در حالی که بیشترین مقدار آن در ریزماهورهای ژنومی $61/5$ بوده است. اسمالدرس و همکاران (2010) از ۶۵ جفت آغازگر توسعه یافته به روش هیبریداسیون ۲۵ جفت آغازگر چندشکل به دست آوردند. گزارش شده است $29/2$ درصد از آغازگرهای توسعه یافته از ESTهای خیار چندشکلی نشان می‌دهند (Yi *et al.* 2006). لیو و همکاران (2010) گزارش کردند $17/7$ درصد از آغازگرهای طراحی شده از ESTهای سویا چند شکل بوده و در هر لوکوس ۲ تا ۸ ال تولید می‌کند. آن‌ها همچنین گزارش کردند شاخص PIC برای این نشانگرها $0/194$ تا $0/794$ بوده است.

همچنین نتایج هم‌ردیفی (BLAST) توالی‌های نشانگرهای چندشکل نشان داد که برخی از این نشانگرها از

VRN1 و *VRN2* برای افزایش هیستون ۳ لیزین ۹ در ناحیه پرموتور ژن *FLC* نیاز است (Bastow *et al.* 2004). پروتئین *VRN1* نسبت به *VRN2* اهمیت بیشتری برای تغییر در ناحیه اینترون ۱ ژن *FLC* دارد، در حالی که *VRN2* برای متیله شدن هیستون ۳ لیزین ۲۷ در ناحیه پرموتور ژن *FLC* کافی است (Bastow *et al.* 2004). با توجه به اهمیت ژن *FLC*، در این تحقیق توالی‌های SSR پرموتر و اینترون ۱ ژن *FLC* چغندر قند بررسی گردید و نشانگر FLC744 معرفی گردید.

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 متیلاسیون در هیستون می‌شود. بیان *FLC* که به شدت با اعمال دوره سرما سرکوب می‌شود، مستقیماً به عنوان مانع تنظیم کننده‌های گلدهی SOC1، FT، 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



شکل ۲ نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در ژل ۸ درصد پلی‌اکریل آمید به همراه نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp

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 صفتهای چغندر قند که ژن‌های آنها در مجاورت آنها است، پیوستگی داشته باشند و می‌تواند در مطالعات آینده بر روی چغندر قند مورد استفاده قرار گیرد.

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 چغندر قند استفاده کرد و یا برای آنالیز ژنتیکی چغندر قند و همچنین گونه‌ها و جنس‌های نزدیک به کار برد. همچنین شش نشانگر ریزماهواره جدید چندشکل نیز برای چغندر

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) markers for 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 markers into 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.