



شناسایی و معرفی سری جدید نشانگرهای SSR در گیاه مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*)

عباس خداکرمی^۱، عبدالعلی شجاعیان^{۱*}، محسن فلاحتی‌عنبران^۲، راحیل موحدی^۱، محسن یادگاری^۱

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

^۲ گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران.

*ایمیل نویسنده مسئول: shojaeiyan@modares.ac.ir

چکیده

مرزه بختیاری با نام علمی *Satureja bachtiarica* Bunge، گیاهی از خانواده‌ی Lamiaceae، است که از زمان‌های باستان گیاهان این جنس به سبب داشتن ارزش دارویی شناخته می‌شدند. گیاه مرزه از جمله گیاهانی است که نه تنها کاربردهای فراوان در طب سنتی دارد بلکه به دلیل داشتن ترکیبات فنی، تیمول و کارواکرول، تأثیر آن بر فعالیت برخی از ایزوله‌های قارچی تا حدودی به اثبات رسیده است. تاکنون محدودیت منابع ژنومی و ژنتیک، بویژه در زمینه نشانگرهای مولکولی، پیشرفت در زمینه پهنزادی مرزه را با محدودیت مواجه ساخته است. بررسی DNA ژنومی گیاهان، و نیز ابداع انواع نشانگرهای ژنتیک، به ویژه نشانگرهای مبتنی بر PCR با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید، همراه با ابزارهای بیوانفورماتیک پیشرفت‌های چشمگیر و قابل‌توجه را در ارزیابی تنوع ژرم‌پلاسم بسیاری از گونه‌های گیاهی به همراه داشته است. براین اساس در انجام این پژوهش، طراحی و انتخاب نشانگرهای SSR جدید توالی‌یابی شده توسط تکنیک توالی‌یابی نسل جدید با استفاده از نرم افزار QDD در جمعیت‌های مختلف مرزه بختیاری، معرفی می‌گردند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیک، ریزماهواره، مرزه، نشانگرهای مولکولی، PCR

مقدمه

مرزه بختیاری با نام علمی *Satureja bachtiarica* Bunge L.، چندساله، انحصاری ایران و متعلق به منطقه زاگرس است که در استان‌های غربی، مرکزی و جنوب غرب ایران می‌روید (فیضی، ۱۳۸۰). برنامه‌های به‌نژادی از طریق تهیه و معرفی ارقام، نژادها و ژنوتیپ‌های جدید و اصلاح‌شده پیشرفت چشمگیر و قابل ملاحظه‌ای در بهبود و افزایش کمی و کیفی محصولات کشاورزی داشته است. در این راستا مواد ژنتیک متنوع گیاهی گنجینه‌ی با ارزشی هستند که اساس کار به‌نژادگران را بنیان می‌نهند. بررسی DNA گیاهی، امکان ارزیابی مستقیم تنوع ژنتیک را ممکن می‌سازد (باقری و همکاران، ۱۳۸۵). ریزماهواره‌ها یا توالی‌های ساده تکراری (SSRs)، موتیف‌های کوتاه تکراری از DNA (معمولاً یک تا شش نوکلئوتید) هستند که در ژنوم تمام یوکاریوت‌ها وجود دارند (Li et al., 2002). این نشانگرها از جنبه‌های گوناگون از قبیل نقشه‌یابی ژنوم، پزشکی‌قانونی، آنالیز والدین، حفاظت ژنتیک، شناسایی والدین در پلی‌پلوئیدی، فیلوژنی و ژنتیک جمعیت می‌توانند کاربرد داشته باشند (Kalia et al., 2011). فلاحتی‌عنبران و همکاران (۲۰۱۷) طی انجام تحقیقی گزارش کردند که نشانگرهای SSR می‌توانند برای بررسی سطوح ساختار ژنتیک و تنوع ژنتیک، برای تعیین سیستم تلقیح، وقایع هیبریداسیون طبیعی و ساخت نقشه‌های لینکاژی در گونه‌های حفاظت شده مورد استفاده قرار گیرند و همچنین می‌توانند در حل مشکلات عمده‌ی ذخایر ژنتیک مفید باشند.

موحدی و همکاران (۲۰۱۸) طی انجام تحقیقی که برای اولین بار گزارش شده است، ساختار ژنتیک و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف مرزه‌ی بختیاری را با توسعه‌ی سری اول نشانگرهای SSR مورد ارزیابی قرار دادند. در این تحقیق ۶۰ فرد از جمعیت‌های مختلف مرزه‌ی بختیاری با ۱۵ آغازگر SSR مورد آزمایش قرار گرفت که ۱۱ عدد از آغازگرها، چندشکلی را نشان دادند. نتایج این تحقیق نشان داد نشانگرهای توسعه یافته، برای به دست آوردن اطلاعات اولیه‌ی ژنتیک جمعیت‌های طبیعی گوناگون مرزه‌ی بختیاری، تأثیر بسزایی داشتند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای توسعه یافته می‌توانند در غربال کردن جمعیت‌های مختلف گونه‌های نزدیک به هم و همچنین متعاقباً می‌توانند در حفظ ذخایر ژنتیک و برنامه‌های اصلاحی کاربرد داشته باشند. به طور کلی این پژوهش، با هدف اصلی شناسایی و معرفی نشانگرهای ریزماهواره جدید در جمعیت‌های مرزه بختیاری طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها

مراحل کار به‌طور کلی شامل استخراج DNA ژنومی از بافت برگ تازه، آماده‌سازی کتابخانه و غنی‌سازی DNA برای نواحی ریزماهواره و در نهایت انجام توالی‌یابی بود. برای انجام توالی‌یابی از روش Malausa و همکاران (2011) (Malausa et al., 2011) استفاده شد که جزئیات آن در مقاله مربوطه اشاره شده است. توالی‌یابی از روش ۴۵۴- GsFLX Titanium chemistry توسط کمپانی GenoScreen انجام گرفت. پس از دریافت کانتینگ‌ها از شرکت توالی‌یابی‌کننده، با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، توالی‌های تکراری شناسایی شدند.

شناسایی نواحی ریزماهواره‌ها و طراحی آغازگرها

برای شناسایی نواحی ریزماهواره و طراحی آغازگرها از نرم افزار QDD استفاده شد. تنظیمات پیش فرض برای اجرای نرم افزار به کار گرفته شدند. مراحل آنالیز این نرم افزار شامل موارد زیر است:

Pipe1: آماده سازی توالی‌ها و ارزیابی نواحی ریزماهواره

توالی‌های ورودی در این مرحله هم می‌توانند توالی‌های اسمبل شده (کانتیک، اسکافولد، کروموزوم) باشد و یا خوانش‌های اسمبل نشده باشد. در توالی‌های اسمبل شده ریزماهواره‌ها همراه با نواحی مجاور در هر دو سمت شناسایی می‌گردند. در توالی‌های اسمبل نشده در این مرحله می‌توان آداپتورها و خوانش‌های کوتاه را حذف و تنها توالی‌های دارای نواحی ریزماهواره برای مراحل بعدی آنالیز حفظ شوند.

Pipe2: ارزیابی توالی‌های مشابه

تمام توالی‌ها با استفاده از بلاست با همدیگر مقایسه شده و بر اساس میزان تشابه‌شان دسته‌بندی می‌شوند. این مرحله بیشترین زمان را به خود اختصاص می‌دهد اما از قسمت‌های ضروری نرم افزار می‌باشد. حذف داده‌های تکراریو زائد یک ضرورت بدیهی است اما توالی‌هایی که قسمتی از نواحی تکراری ژنوم هستند اغلب نادیده گرفته می‌شوند. این بی‌توجهی به دلیل عدم وجود اطلاعات در مورد پس زمینه ژنومی بیشتر گونه‌ها است. QDD

نتایج و بحث

مشخصات آغازگرهای شناسایی و معرفی شده در جدول ۱ خلاصه شده است، با توسعه و شناسایی ریزماهواره‌های جدید می‌توان تنوع ژنتیک جمعیت‌های بررسی نشده را مورد ارزیابی قرار داد و فواصل ژئوگرافی موجود بین آن‌ها را اندازه‌گیری نمود. حضور ریزماهواره‌ها در نواحی کد شونده منجر به ظهور الگوهای تکراری در توالی آمینواسیدها خواهددشد. بیشترین موتیف‌های به دست آمده موتیف‌های تترانوکلئوتیدی با توالی ACTC، AGAT و AATC بوده که پس از آن موتیف‌های تری نوکلئوتید با توالی AAG می‌باشد. جدول شماره ۱، مشخصات آغازگرهای شناسایی و معرفی شده.

جدول شماره ۱، مشخصات آغازگرهای شناسایی و معرفی شده.

کد آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر برگشت (3'→5')	توالی نوکلئوتیدی آغازگر رفت (3'→5')
SB54	CCCACGTGCTGATGTTAGGC	TCATGGCACTGGTAGCAACT
SB55	GGAAGCAATCACTATGTGTACG	CCGTGCTGTGGGAAAGTAT
SB56	TTCCTATGGTTATGGAGTGAGG	TGCCACITCACTTGGCTAAA
SB57	TCGACTCGGTAAGTCTCTATACC	CTGCGGCTACTAATCTGCCT
SB58	GAAGAAAGAGGGCGGTGAG	ATCATCCACACCAAGCTGAAA
SB59	TCCTACGATTGAAGTCACTTATG	ATGCCATGCACITCAAACAC
SB62	CTCATGTACACACATGCCAAATCA	TGGGCAAAGATATGGAGATAGAA
SB64	TATCTCCCTCCCTCACCG	GGGATTAAATGCTCAAGCCAGG
SB66	GCTGCAGATTGGATGATGA	TATACACCACGAATCCGCC
SB67	CTCGATCAGTGGTGGTTAAG	GCATGGCCCTAAGAATCAA
SB68	TCITTACTCCGCTGCTTCCT	GAACAATCATTTGTGTCGATGA

آغازگرها بر اساس توالی مورد نظر طراحی شدند. با ظهور سیستم‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS) مقادیر زیادی از داده‌های توالی‌یابی شده، تولید شده که می‌توانند با کمک ابزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی توالی‌های تکراری ریزماهواره‌ها مورد استفاده قرار گیرند. شناسایی نواحی ریزماهواره و طراحی آغازگرها توسط نرم افزار QDD شامل مراحل آماده‌سازی توالی‌ها و ارزیابی نواحی ریزماهواره، ارزیابی توالی‌های مشابه و طراحی آغازگرها بر اساس تنظیمات پیش فرض می‌باشد. در این تحقیق، برای هر کدام از توالی‌ها براساس پیشنهاد آغازگرهای طراحی شده توسط نرم‌افزار بهترین آغازگر انتخاب گردید. بنابراین انتخاب نشانگر بر طبق اصول زیر انجام پذیرفت: انتخاب ریزماهواره‌هایی با تعداد تکرار بیشتر (چندشکلی بالاتر)، اجتناب از انتخاب ریزماهواره‌های دارای توانایی تشکیل هریپین مانند AT، اجتناب از انتخاب آغازگرهای بسیار نزدیک به جایگاه هدف (کمتر از ۲۰ جفت باز) و اجتناب از انتخاب آغازگرها در توالی‌های اجماع.

منابع

باقری، ع. ا.، ایزدی‌دربندی، ع. و.، ملبویی، م. ع.، (۱۳۸۵). کاربردهای عملی بیولوژی مولکولی گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۲۳۴ صفحه
فیضی، م. ت.، (۱۳۸۰). معرفی مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*) و ویژگی‌های اکولوژیکی آن در استان اصفهان (اولین گزارش گونه از استان اصفهان)، همایش ملی گیاهان دارویی ایران. مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، صفحه ۳۳۷.

Falahati-Anbaran, M., Stenøien, H.K., Bolstad, G.H., Hansen, T.F., Pérez-Barrales, R., Armbruster, W. S., and Pélabon, C. (2017). Novel microsatellite markers for *dalechampia scandens* (Euphorbiaceae) and closely related taxa: application to studying a species complex. Plant Species Biology, 32: 179-186.

Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh R., and Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica. 177: 309–334.

Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beilies, A., and Nevo, A. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. Molecular Ecology, 11: 2453–2465.

Malausa, T., Gilles, A., Megléc, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P. and Delye, C. (2011). High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. Molecular Ecology Resources, 11, 638-644.

Movahedi, R., Shojaeiyan, A., Falahati-Anbaran, M., and Ayyari, M. (2019). Genetic structure and diversity in natural populations of a medicinal vegetable, *satureja bakhtiaria*, inferred from microsatellite markers developed using next-generation sequencing. Plant Molecular Biology Reporter, 37: 14–23.