

شناسایی نشانگرهای EST-SSR عدس (*Lens culinaris*) تحت تنش سرما

سیدسجاد سهرابی^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳، حسین فلاحی^۴

۱. دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۴. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۴/۲۹)

Discovery of EST-SSRs Markers in Lentil (*Lens culinaris*) under Cold Stress

Seyed Sajad Sohrabi¹, Ahmad Ismaili^{2*}, Farhad Nazarian Firouz-Abadi³, Hossein Fallahi⁴

1. Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received: Mar. 10, 2018 - Accepted: Jul. 18, 2018)

Abstract

Development and improvement of lentil breeding programs to deal with adverse environmental factors in comparison to other legumes has more challenges due to poor pool of genetic resources. EST-SSR (EST-Simple Sequence Repeats) markers are one of the most commonly used molecular markers in many plant breeding programs due to polymorphism in genes coding regions. Hence, in the present study, for the development of EST-SSR markers, assembly process of RNA sequences of lentil under cold stress and normal condition was used. In order to apply cold stress, lentil plants treated at 4 °C condition. Total RNA was extracted from plant samples and was sequenced. 8905 microsatellite locations in 7211 unigene derived from lentil RNA sequences data was identified that 1293 unigene of them contained more than one SSR marker location. The most abundant type of EST-SSR marker was found to be of single nucleotide type. In this study, A/T, AG/CT and AAG/CTT motifs had the highest frequency among the one, two and three nucleotide motifs, respectively. The results of blast of unigene containing SSR showed that 80% of the unigenes had a similar record in the non-redundant protein database. The functional annotation of the unigenes showed that unigene containing SSR marker are subordinate to the critical stress-responsive terms such as binding, cell, cell parts and metabolic. Also, according to the results of this study, it can be stated that most of the identified EST-SSR markers were found in genes that play an important role in responding to cold stress, and UTR regions is often possible position. Hence, more analysis of these areas in candidate gene transcripts in response to cold stress is more important.

Keywords: Cold stress, Lentil, Tri-nucleotide repeat motifs, EST-SSR markers

چکیده

توسعه برنامه‌های به‌نژادی عدس برای مقابله با عوامل نامساعد محیطی نسبت به سایر حبوبات، به علت کمبود منابع ژنتیکی با چالش‌های بیشتری روبرو می‌باشد. نشانگرهای EST-SSR به دلیل ایجاد چندشکلی در نواحی کدکننده ژن‌ها، یکی از پرکاربردترین نشانگرهای مولکولی در بسیاری از برنامه‌های اصلاحی به‌شمار می‌روند. از این‌رو در تحقیق حاضر به‌منظور توسعه نشانگرهای EST-SSR در مقیاس بالا، از فرآیند سرهم‌بندی مجموعه خوانش‌های کوتاه حاصل از فناوری توالی‌یابی RNA عدس تحت تنش سرما و حالت طبیعی استفاده شد. به‌منظور اعمال تنش سرما، گیاهچه‌های ۲۱ روزه عدس به مدت ۴۸ ساعت در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از نمونه‌های گیاهی تهیه شده، RNA کل استخراج شد و مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. تعداد ۸۹۰۵ مکان ریزماهوره در ۷۲۱۱ یونی‌ژن حاصل از داده‌های RNA-seq عدس شناسایی شد که ۱۲۹۳ یونی‌ژن شامل بیش از یک مکان نشانگر SSR بود. فراوان‌ترین نوع نشانگر EST-SSR یافت شده از نوع تک نوکلئوتیدی بود. در این مطالعه موتیف‌های A/T، AG/CT و AAG/CTT به ترتیب بیشترین فراوانی را در بین موتیف‌های تک، دو و سه نوکلئوتیدی به خود اختصاص دادند. نتایج بلاست یونی‌ژن‌های حاوی SSR نشان داد که ۸۰ درصد از یونی‌ژن‌ها دارای رکورد مشابه در پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری بودند. تفسیر کارکردی ژن‌ها، حضور یونی‌ژن‌های حاوی ریزماهوره را در زیرگروه‌های مهم پاسخ به تنش سرما نظیر اتصال، سلول و اجزای سلول و متابولیک را نشان داد. همچنین با توجه به نتایج می‌توان چنین اظهار نمود که اغلب نشانگرهای شناسایی شده در ژن‌هایی قرار داشتند که نقش مهمی در پاسخ به تنش سرما دارند و جایگاه احتمالی اغلب آن‌ها نواحی UTR می‌باشد. از این‌رو بررسی بیشتری این نواحی در رونوشت ژن‌های کاندید پاسخ‌دهنده به تنش سرما از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش سرما، عدس، موتیف‌های سه نوکلئوتیدی، نشانگر EST-SSR

مقدمه

عدس زراعی (*L. culinaris* ssp. *culinaris*) گیاهی دیپلوئید ($2n=2X=14$)، خودگردانه‌افشان و با اندازه ژنومی معادل ۴ گیگا باز (Arumuganathan and Earle, 1991)، سومین گیاه مهم از گروه حبوبات دانه‌ای سردسیر محسوب می‌شود (Khazaei *et al.*, 2016). دانه عدس غنی از پروتئین (۲۲ تا ۳۵ درصد)، مواد معدنی و کربوهیدرات بوده و در بسیاری از کشورها یکی از اصلی‌ترین منابع تأمین پروتئین برای میلیون‌ها نفر از مردمان کم‌درآمد محسوب شده و همین امر عامل توسعه کشت این محصول در جهان و افزایش پنج برابری عملکرد جهانی این محصول طی نیم‌قرن اخیر بوده است (Erskine, 2009; Srivastava, 2012; Kumar *et al.*, and Vasishtha, 2012; 2013). با گسترش کشت عدس در مناطق غیربومی از یک‌سو و تغییرات جهانی اقلیم از سوی دیگر، احتمال برخورد مراحل رشدی این گیاه با تنش‌های محیطی مختلف افزایش یافته، در نتیجه پتانسیل تولید این محصول در برخی از نقاط کشت این محصول کمتر از میانگین جهانی می‌باشد (Sultana *et al.*, 2014). کشور ما با داشتن اقلیم خشک و نیمه‌خشک و همچنین دامنه نوسانات دمایی بالا، از شرایط کاملاً مطلوب و بهینه جهت کشت عدس برخوردار نبوده و میانگین عملکرد این محصول در مناطق کشت عدس که غالباً دیم می‌باشند، پایین‌تر از میانگین جهانی است (Sabaghpour *et al.*, 2013). هر چند عدس گیاهی سرمادوست می‌باشد، اما اغلب ارقام تجاری عدس دمای بسیار پایین مناطق کشت سردسیر عدس، طی زمستان را تحمل نمی‌کنند (Kumar *et al.*, 2013). این درحالی است که کشت زمستانه عدس با ارقام متحمل به دمای پایین، موجب افزایش ۲۰ تا ۱۰۰ درصدی پتانسیل عملکرد این محصول خواهد شد (Barrios *et al.*, 2017). در ایران به علت در دسترس نبودن ارقام

مقاوم به سرما این محصول به‌صورت بهاره کشت می‌گردد (Majnoon Hosseini, 2008).

گرچه پژوهش‌های متعددی در جهت توسعه حبوبات دانه‌ای صورت گرفته است، اما برنامه‌های اصلاحی برای بهبود عملکرد کمی و کیفی این محصولات از جمله عدس، به‌دلیل کمبود محتوای ژنتیکی هنوز نیز با چالش‌های زیادی مواجه می‌باشد (Sultana *et al.*, 2014). تاکنون روش‌های اصلاح‌نیاتات کلاسیک در عدس در بهبود برخی از صفات تک ژنی مؤثر بوده ولی استفاده تنها از این رویکرد در اصلاح اغلب صفات کمی نظیر تحمل به تنش‌های محیطی، وقت‌گیر و پرهزینه می‌باشد (Kumar *et al.*, 2014). از طرف دیگر برنامه‌های به‌نژادی عدس به‌علت ژنوم بزرگ با DNA تکراری بالا، پایه ژنتیکی باریک، فقدان ژن‌های کاندید و نبود نقشه‌های ژنتیکی نسبت به سایر حبوبات دانه‌ای مانند نخود و لوبیا با چالش‌های بیشتری روبرو می‌باشد (Sudheesh *et al.*, 2016).

نشانگرهای مولکولی با توسعه نقشه‌های ژنتیکی و افزایش اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم گیاهی، در بهبود به برنامه‌های اصلاحی بسیار مؤثر می‌باشند. نشانگرهای SSR با میزان بالای چندشکلی، تکرارپذیری بالا، توارث هم‌باز و اختصاصی بودن، یکی از پرکاربردترین نشانگرها در حوزه تنوع ژنتیکی به‌شمار می‌روند (Powell *et al.*, 1996). EST-SSR گروه مهمی از نشانگرهای ریزماهواره محسوب می‌شوند که در نواحی کدکننده ژن قرار گرفته‌اند، و منبع ارزشمندی در مورد عملکرد ژن‌ها به‌شمار رفته و در انتخاب به‌وسيله نشانگر کارایی بالاتری دارند (Varshney and Tuberosa, 2007; Wang *et al.*, 2017a)؛ اما از سوی دیگر هزینه بالا، زمان‌بر بودن و کار آزمایشگاهی نسبتاً زیاد از جمله معایب روش‌های سنتی توسعه نشانگرهای

رشدی و رونوشت‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پرداخته‌اند، نسبت به سایر حبوبات بسیار اندک می‌باشد. تنها گزارش استفاده از روش RNA-seq برای بررسی ترنسکریپتوم عدس تحت تنش غیرزیستی مربوط به Singh و همکاران می‌باشد که نشان دادند که ۱۸۳۶۹ رونوشت در شرایط خشکی و شرایط شاهد اختلاف بیان دارند. به‌علاوه ۹۹۴۹ مورد SSR، ۸۲۶۰ مورد SNPs و ۱۲۸۴ مورد INDELS با موفقیت شناسایی شد که می‌تواند به‌عنوان منابع جدید برای مطالعات ژنتیکی و ژنومیکس کارکردی برای تحمل به خشکی در عدس به‌کار روند (Singh et al., 2017).

با توجه به این‌که تاکنون در مورد تغییرات پروفایل بیانی گیاه عدس تحت تنش‌های دمایی گزارشی وجود ندارد، هدف از این مطالعه تهیه و تحلیل سرهم‌بندی نوپدید ترنسکریپتوم عدس تحت تنش سرما و شناسایی نشانگرهای ریزماهوره مربوط به آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش

پس از تهیه بذر عدس (رقم گچساران) از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (ایستگاه گچساران)، بذور با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و پس از سه مرتبه آبشویی با آب مقطر در گلدان‌های حاوی ورمیکولیت، پیت‌موس و شن (نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند. گلدان‌ها به اتاق کشت با شرایط شدت نوری ۱۴۰۰-۱۲۰۰ لوکسی، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و تا برداشت نمونه با محلول نیم‌هوگلد آبیری و تغذیه شدند. پس از سه هفته از سبز شدن (گیاهچه‌های ۲۱ روزه)، به‌منظور اعمال تیمار تنش، گلدان‌ها به دو گروه (تنش و عدم تنش) با تعداد مساوی تقسیم شدند. هر گروه تیماری شامل ۴ تکرار بود که در هر تکرار ۵ گلدان وجود داشت.

SSR به‌شمار می‌روند. توالی‌یابی نسل جدید (NGS) که مبتنی بر فناوری توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا می‌باشد، جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی تحلیل ترنسکریپتوم بوده و فرصتی کلیدی برای تحلیل پروفایل بیانی گیاهان تحت تنش‌های محیطی و همچنین چارچوبی از اطلاعات برای کشف سریع، کم‌هزینه و با مقیاس بالای نشانگرهای مبتنی بر ژن‌های تحمل به تنش فراهم می‌سازد (Alves-*et al.*, 2015).

تعداد نشانگرهای ریزماهوره در جنس عدس بسیار محدود است. Hamweigh و همکاران (۲۰۰۹)، ۱۴ نشانگر ریزماهوره در رقم ILL5588 شناسایی کردند. شاخص تنوع حاصل از این ریزماهوره‌ها بسیار بالا گزارش شد به‌طوری که با دقت بالا گونه‌های وحشی را از ارقام زراعی متمایز می‌نمود (Hamwieh et al., 2009). در مطالعه‌ی دیگر ۷۹ نشانگر EST-SSR با درصد چندشکلی بالا در ۱۳ ژنوتیپ عدس و یک رقم وحشی شناسایی شد (Kaur et al., 2011). در پژوهش Verma و همکاران (۲۰۱۳) که از داده‌های ترنسکریپتومی رقم Precoz استفاده شده بود الگوی نشانگرهای EST-SSR را در این رقم شناسایی کردند و همچنین ۵۴ نشانگر EST-SSR را در بین ۲۲ ژنوتیپ زراعی و وحشی شناسایی و اعتبارسنجی نمودند (Buchwaldt et al., 2004).

تاکنون مطالعات ترنسکریپتومی زیادی با استفاده از فن RNA-Seq برای شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش‌ها و نشانگرهای SSR وابسته به آن‌ها گزارش شده است (Alisoltani et al., 2016; Long et al., 2014; Wang et al., 2017a, b). با این حال تعداد مطالعاتی که به بررسی ترنسکریپتوم عدس برای شناسایی رونوشت‌های ویژه‌ی مرحله

طول ۱۵۰ جفت باز خوانش شدند. کنترل کیفیت و سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه با توجه به تأثیر کیفیت داده‌های ورودی بر نحوه ایجاد اسمبلی، کیفیت اولیه توالی‌های خام برای همه نمونه‌ها سنجیده شد. سپس به منظور حذف خطای احتمالی توالی‌یابی و همچنین توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰) فرآیند ترمیم انجام شد. پس از کیفیت‌سنجی خوانش‌های کوتاه (Short Reads)، سرهم‌بندی نوپدید (De novo assembly) با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (v7.5.0) (CLC) با پارامترهای (bio, Aarhus, Denmark) به منظور حذف کانتیگ‌های اضافی از مجموعه نرم‌افزاری (V2013.07.27) EvidentialGene استفاده شد.

شناسایی نشانگر ریزماهواره (SSR)

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از نرم‌افزار MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>) انجام شد. حداقل تکرار برای نشانگرهای مونو، دی، تری، تترا، پنتا و هگزا نوکلئوتیدی به ترتیب ۱۰، ۶، ۵، ۵، ۵ و ۵ تعیین شد و همچنین حداکثر فاصله بین دو مکان نشانگر روی یک توالی ۱۰۰ bp تعیین شد (Dai et al., 2017). توزیع فراوانی تکرارها و ترکیب مکان‌های ریزماهواره شناسایی شده، محاسبه شد.

سرهم‌بندی EST‌های ثبت شده عدس به منظور شناسایی نشانگرهای EST-SSR

به منظور بررسی و مقایسه نشانگرهای EST-SSR شناسایی شده توسط فرآیند توالی‌یابی، با نشانگرهای EST-SSR استخراجی از توالی‌های EST عدس، EST‌های ثبت شده عدس در پایگاه NCBI (تا تاریخ ۲۰۱۸/۰۳/۰۶) با فرمت Fasta دریافت شد. پس از حذف توالی‌های وکتوری، تکراری و اندامکی

گروه اول به اتاقتک سرما با دمای ۴ درجه و بخش دیگر که به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شده بودند در تمام این مدت در اتاقتک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مدت زمان اعمال تنش سرما با توجه به مرور منابع (Saha et al., 2015; Al-Quraan et al., 2013) ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. پس از اعمال تیمار به منظور استخراج RNA تام در هر کدام از گروه‌های تیماری، نمونه تازه از بافت برگ تهیه و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت و تا زمان استخراج RNA در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

با استفاده از محلول تریزول (Trizol reagent) طبق پروتکل شرکت سازنده (Invitrogen, life technology, USA)، RNA تام از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ، برای همه نمونه‌ها در هر دو وضعیت تنش و کنترل استخراج شد. سپس کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه پیکودراپ و ژل (۱ درصد) الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه کتابخانه cDNA و توالی‌یابی

برای ساخت کتابخانه cDNA از هر نمونه ۳ میکروگرم RNA تام با درجه یکپارچگی^۱ (الگوریتم تعیین کیفیت RNA بر اساس نسبت 28S به 18S rRNA) بیشتر از ۷ استفاده شد. کتابخانه‌های cDNA توسط کیت Illumina TruSeq™ RNA Sample Preparation طبق پروتکل شرکت سازنده ساخته شدند. در نهایت از پلتفرم Illumina HiSeq2500 برای فرآیند توالی‌یابی کتابخانه‌ها استفاده شد. قطعات از دو طرف (Paired-end) و با

1. RNA integrity number (RIN)

شد. در نهایت پس از فرآیند تریم و حذف خوانش‌های کوتاه (با Phred score پایین‌تر از ۲۰)، تعداد ۱۷۱۵۰۶۱۵۲ خوانش کوتاه حاصل شد که از این توالی‌ها در فرآیند اسمبلی استفاده شد.

سرهم‌بندی نوپدید و حذف رونوشت‌های تکراری
سرهم‌بندی (اسمبلی) رونوشت‌های عدس با استفاده از ادغام خوانش‌های تریم شده (Trimmed reads) ۴ کتابخانه، اسمبلی اولیه‌ای با ۶۵۹۹۳ رونوشت ایجاد کرد. در گیاهانی که ژنوم آن‌ها به‌طور کامل توالی‌یابی و مستندسازی نشده است، بهترین تعداد یونی‌ژن باید به میزان ژن‌های کد شونده در نزدیک‌ترین گیاه مدل به آن باشد (Sudheesh *et al.*, 2016). نتایج سایر مطالعات و همچنین مطالعه حاضر نشان داد که ژنوم عدس بیشترین شباهت را با ژنوم یونجه یک‌ساله (*Medicago truncatula*) دارد (Sudheesh *et al.*, 2016). تعداد ژن‌های کدکننده یونجه یک‌ساله در پایگاه Ensembl حدود پنجاه‌هزار مورد ثبت شده است، از این‌رو به‌منظور کاهش تعداد رونوشت‌های اضافی از مجموعه ابزار Evidential Gene tr2aacds استفاده شد. تعداد یونی‌ژن‌های حاصل از رویکرد Evidential Gene tr2aacds (۴۸۰۲۱) بود که کمترین فاصله را با تعداد ژن‌های کدکننده یونجه یک‌ساله (۵۰۴۴۴) داشت و همچنین میزان کل رونوشت‌ها ۵۶/۷ Mb بود که این مقدار نیز میزان مناسبی برای ترنسکرپتوم گیاهان زراعی دیپلوئید (۵۰-۸۰ Mb) محسوب می‌شود (Sudheesh *et al.*, 2016).

نتایج بلاست اسمبلی ساخته‌شده علیه پایگاه NR نشان داد که ۷۰ درصد از رونوشت‌ها با حد آستانه $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ دارای رکورد در پایگاه NR بودند. نتایج مطالعه Sudheesh و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان داد که رفرنس ترنسکرپتوم حاصل از بافت‌های مختلف عدس نیز ۷۱ درصد با پایگاه NR تطابق دارد (Sudheesh *et al.*, 2016). با توجه به

(میتوکندری و کلروپلاستی) توسط نرم‌افزار CLC (V2.3.0) vmatch، با استفاده از نرم‌افزار Genomics Workbench فرآیند سرهم‌سازی توالی‌ها انجام شد.

مستندسازی و تفسیر کارکردی یونی‌ژن‌های حاوی نشانگر EST-SSR

به‌منظور مستندسازی و تفسیر کارکرد یونی‌ژن‌های حاوی نشانگر EST-SSR از ابزار BLASTx نرم‌افزار NCBI Blast+ (v2.6.0) استفاده شد (Altschul *et al.*, 1997). یونی‌ژن‌های حاوی نشانگر EST-SSR در مقابل پایگاه‌های داده‌های پروتئینی نظیر NR (Non-Redundant proteins) (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db>) و داده‌های پروتئینی گیاهان *Arabidopsis thaliana* و *Medicago truncatula arietinum* (<https://www.phytozome.jgi.doe.gov>) با در نظر گرفتن حد آستانه معادل $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ مورد هم‌ترازی محلی (Local BLASTx) قرار گرفت. به‌منظور هستی‌شناسی یونی‌ژن‌های حاوی EST-SSR از وبسایت AgriGo (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGov2>) و پایگاه ترنسکرپتومی *Medicago truncatula* (Du *et al.*, 2010) از آزمون دقیق فیشر به‌منظور بررسی معنی‌داری گروه‌های غنی شده ژنی^۲ با حد آستانه $FDR \leq 0.05$ استفاده شد.

نتایج و بحث

توالی‌یابی و کنترل کیفیت

طی فرآیند تریم به‌طور میانگین ۷/۷۴ درصد از خوانش‌های کوتاه از ۴ کتابخانه RNA-seq حذف

1. Functional annotation

2. Gene set enrichment analysis

از موتیف‌های تک نوکلئوتیدی از نوع موتیف A/T بودند (شکل ۱). در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۷) نیز موتیف A/T در بین موتیف‌های تک نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از ترنسکریپتوم کلزا بیشترین میزان فراوانی را نشان داد (Chen *et al.*, 2017). در برخی از مطالعات که شناسایی نشانگرها در مقیاس وسیع و مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید صورت می‌گیرد از ذکر فراوانی موتیف‌های "مونو" به علت وجود خطاهای دستگاه‌های توالی‌یابی چشم‌پوشی گردید. علت وجود چنین رخدادی در ترنسکریپتوم عدس را می‌توان به خطای موجود در خوانش‌ها، نوع نرم‌افزار شناساگر نشانگرها و ساختار کلی ژنوم عدس مربوط دانست، به‌طوری‌که حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد از کل ژنوم درون هسته‌ای عدس را توالی‌های تکراری تشکیل می‌دهد (Sudheesh *et al.*, 2016).

به‌منظور تأیید و مقایسه نتایج شناسایی نشانگرهای EST-SSR در مقیاس وسیع ترنسکریپتوم عدس، نتایج شناسایی این نشانگرها در توالی‌های سرهمسازی شده EST در جدول ۲ ارائه شد. نتایج نشان داد که ۱۰۱۹۰ EST عدس در ۱۰۳۴ توالی سرهم سازی شدند. در بین ۱۰۳۴ توالی ۱۶۸ مکان نشانگر شناسایی شد. در ۱۵۲ توالی حداقل یک نشانگر شناسایی شد این در حالی بود که در بین این توالی‌ها ۱۶ توالی بیش از ۱ مکان نشانگر و ۹ توالی دیگر نیز دارای نشانگر ترکیبی بودند. در کل بیشترین فراوانی موتیف‌های تک نوکلئوتیدی به موتیف A/T (تقریباً ۵۰ درصد) اختصاص یافت (شکل ۲). بنابراین با توجه به این‌که در هر دو فایل اسمبلی، موتیف‌های تک نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی را دارند، مبحث خطای توالی‌یابی نمی‌تواند علت افزایش فراوانی موتیف‌های تک نوکلئوتیدی در نشانگرهای شناسایی شده در مقیاس بالا باشد. از این‌رو علت این امر را می‌توان بیشتر به ساختار ژنوم عدس منتسب نمود. موتیف‌های ۲ نوکلئوتیدی "دی" ۱۷/۲۰ درصد از

اینکه تنها ۲۴۶۹ یونی‌ژن در پایگاه داده NCBI برای عدس ثبت شده است، مستندسازی و تعیین گروه‌های کارکردی رونوشت‌های حاصله، تولید محتوا و افزایش اطلاعات ژنتیکی عدس را در پی خواهد داشت (Kaur *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2017).

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره

نتایج نشان داد که در مجموع، ۸۹۰۵ مکان نشانگر SSR در کل یونی‌ژن‌های حاصله شناسایی شد. ۷۲۱۱ (۱۵ درصد از کل) یونی‌ژن دارای حداقل یک موتیف SSR و ۱۲۹۳ (۲ درصد) یونی‌ژن شامل بیش از یک مکان نشانگر SSR بودند (داده‌ها آورده نشده‌اند). همچنین ۷۰۱ یونی‌ژن نیز دارای موتیف‌های پیچیده (ترکیبی) SSR بودند. این میزان نشانگر در ترنسکریپتوم نسبت به میزان مکان SSR برای گندم (۷/۴۱ درصد)، جو (۲/۸ درصد) و شبدر (۷/۶۰ درصد) بیشتر بود ولی نسبت به قهوه (۱۸/۵ درصد) کمتر می‌باشد (Zheng *et al.*, 2013).

همچنین نتایج نشان داد که خروجی فرآیند شناسایی نشانگر EST-SSR با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل جدید به‌مراتب بیشتر از روش‌های سنتی می‌باشد. در بسیاری از پژوهش‌ها به کیفیت بالای نشانگرهای شناسایی شده با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل جدید اشاره شده و از آن‌ها به‌عنوان منبع ارزشمندی جهت توسعه نقشه‌های ژنتیکی نام برده شده است (Kaur *et al.*, 2011).

موتیف‌های تک نوکلئوتیدی (مونو) بیشترین فراوانی (۵۱/۱۳ درصد) را در بین نشانگرهای شناسایی شده به خود اختصاص دادند (جدول ۱). در سایر پژوهش‌ها که به‌منظور شناسایی نشانگر SSR بر روی گیاه *Herba houttuyniae*، قهوه و چای صورت گرفت، به نقل از Wang و همکاران (۲۰۱۷) موتیف‌های "مونو" بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند (Wang *et al.*, 2017a). ۹۹ درصد

موتیف سه نوکلئوتیدی در بین گیاهان دولپه به شمار می‌رود (Wang *et al.*, 2011). همچنین نشانگرهای ۳ نوکلئوتیدی با عدم تغییر قاب خوانش باز پتانسیل بالاتری جهت بررسی ژن‌های کدکننده برخوردارند، از این رو این موتیف برای بررسی ژن‌های کارکردی دخیل در تنش‌های غیرزیستی مؤثرتر خواهند بود. Kaur و همکاران (۲۰۱۱) بدون در نظر گرفتن موتیف‌های مونو در گزارش نتایج شناسایی نشانگرهای EST-SSR عدس، موتیف‌های سه نوکلئوتیدی را به‌عنوان موتیف‌های با بیشترین فراوانی معرفی نمودند (Kaur *et al.*, 2011).

موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی به‌ترتیب دارای فراوانی ۱۵۱۱، ۹۵، ۲۱ و ۳۳ در بین کل موتیف‌ها بودند. با افزایش میزان تعداد نوکلئوتیدها در موتیف‌ها احتمال حضور و تکرار شدن آن‌ها در ژنوم کاهش می‌یابد. موتیف‌های AAAT/ATTT، AAGAGG/CCTCTT و AAGAG/CTCTT به‌ترتیب در گروه موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی را نشان دادند.

توزیع چگالی حضور موتیف‌های ESST-SSR در ترنسکرپتوم عدس ۳/۳kb محاسبه شد. این مقدار نسبت به سایر حبوبات دانه‌ای دیپلوئید پایین‌تر بود. علت چنین رخدادی را می‌توان به اندازه ژنوم بزرگ عدس که تقریباً ۸/۵ برابر لوبیا، ۵/۵ برابر نخود و ۳/۵ برابر سویا است مرتبط دانست. همچنین چگالی پایین‌تر را می‌توان با فراوانی موتیف‌های با اندازه کوتاه در ارتباط دانست (Varshney *et al.*, 2005). با توجه به این‌که طول نواحی UTR در ژن‌های کدکننده عدس بیشتر از سایر اعضای هم‌خانواده خود می‌باشد (Sudheesh *et al.*, 2016).

از سوی دیگر حضور نشانگرهای EST-SSR در نواحی ۳' و ۵' بخش UTR ژن بیشتر از سایر نواحی گزارش شده است (Xu *et al.*, 2018)، از این رو UTR‌های ژن‌های کدکننده عدس را می‌توان به‌عنوان جایگاه احتمالی نشانگرهای EST-SSR

کل مکان نشانگرها را به خود اختصاص دادند که در این بین، موتیف AG/CT بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص داد. به‌طور مشابه در اسمبلی EST‌های عدس نیز موتیف AG/CT بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص داد. نتایج مطالعه Gupta و همکاران (۲۰۱۶)، نیز نشان داد که موتیف AG/CT در بین نشانگرهای دو نوکلئوتیدی بیشترین تکرار را در ترنسکرپتوم عدس دارد و از این منظر نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌نماید (Gupt *et al.*, 2016).

در اغلب مطالعاتی که فراوانی موتیف‌های ۲ تا ۶ نوکلئوتیدی را بررسی شده است، موتیف ۲ نوکلئوتیدی پس از ۳ نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی را در بین موتیف‌ها دارد. در همین راستا در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۱) موتیف دی نوکلئوتید AG/CT با ۹۴ جفت باز بیشترین میزان فراوانی را در بین موتیف‌های ۲ نوکلئوتیدی ترنسکرپتوم *Ipomoea batatas* را به خود اختصاص داد (Wang *et al.*, 2011).

موتیف سه نوکلئوتیدی "تری" بعد از موتیف تک نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی (۲۹/۹۷ درصد) را به خود اختصاص دادند (جدول ۱). فراوانی بالاتر ریزماهوره‌های سه نوکلئوتیدی نسبت به ریزماهوره‌های دو نوکلئوتیدی به این علت است که تغییر در تعداد تکرار ریزماهوره‌های غیر سه نوکلئوتیدی منجر به تغییر مکانی چارچوب توالی کدکننده می‌شود؛ بنابراین احتمال حضور این ریزماهوره‌ها در ناحیه کدکننده کمتر است (Luro *et al.*, 2008). هرچند در برخی مطالعات نیز نتایج متفاوتی گزارش شده است. در بین موتیف‌های ریزماهوره سه نوکلئوتیدی موتیف AAG/CTT بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص داد و در مقابل موتیف ACG/CGT کمترین میزان را به خود اختصاص داد (شکل ۱). بررسی نتایج سایر مطالعات مشابه نشان داد که موتیف AAG/CTT، فراوان‌ترین

معرفی نمود.

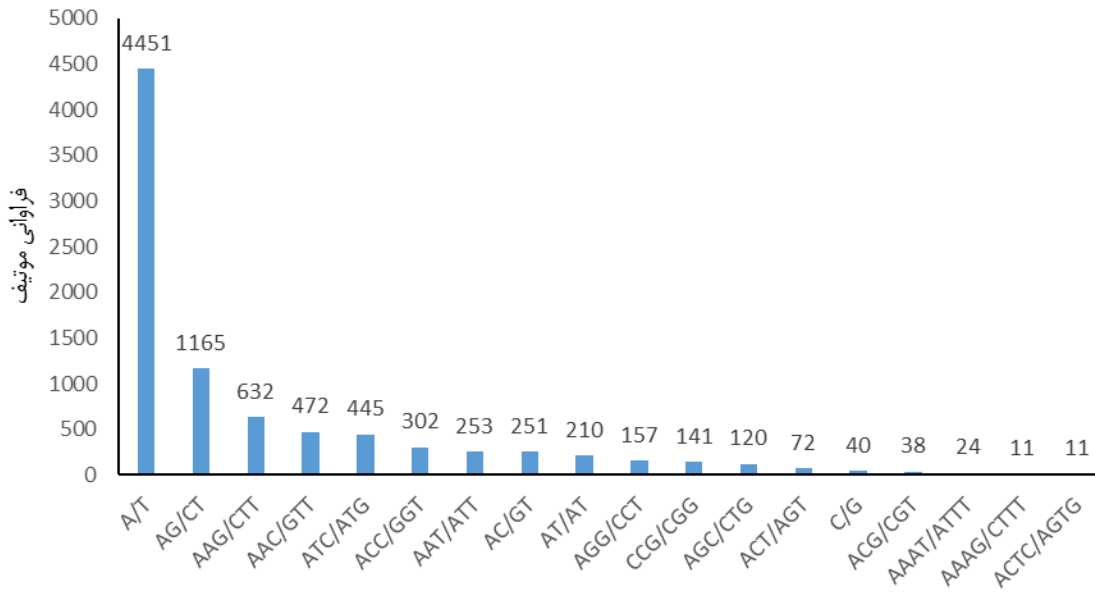
جدول ۱. توزیع موتیف/تکرارهای نشانگر SSR در ترنسکرپتوم عدس تحت تنش سرما با استفاده از سرهم‌سازی

خوانش‌های کوتاه

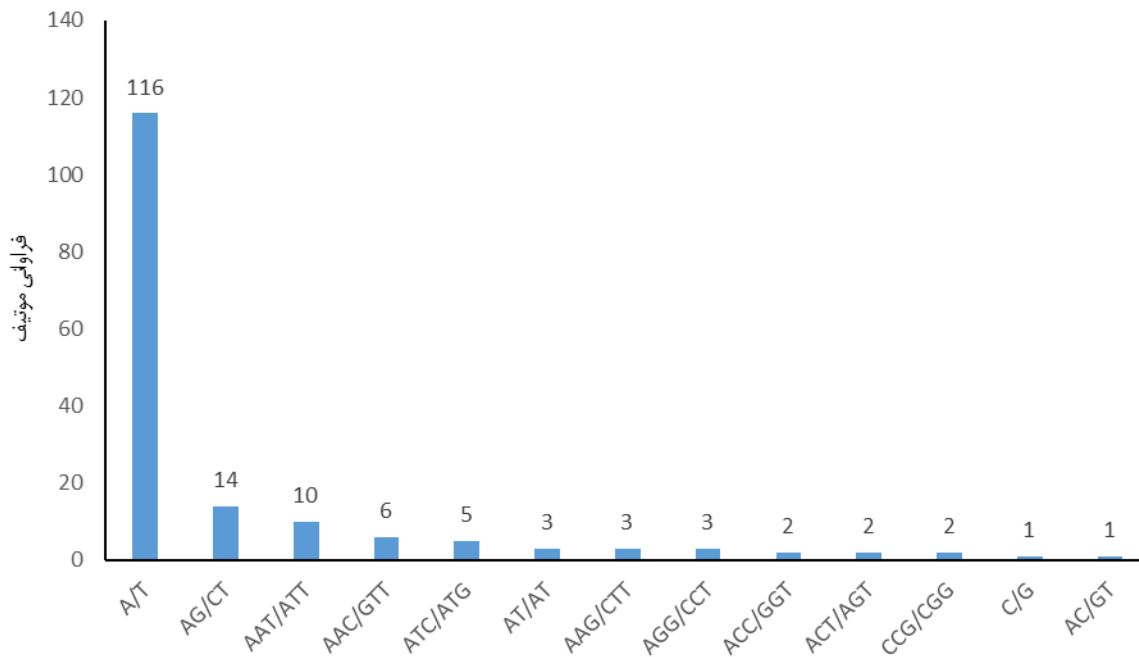
تکرار	موتیف						مجموع	درصد
	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Hexa-		
5	0	0	1476	77	18	26	1597	18.18
6	0	523	622	11	3	5	1164	13.25
7	0	274	247	2	0	1	524	5.97
8	0	166	95	3	0	0	264	3.01
9	0	167	66	0	0	1	234	2.66
10	2076	85	23	1	0	0	2185	24.88
11	783	34	23	0	0	0	840	9.56
12	441	29	17	1	0	0	488	5.56
13	235	18	10	0	0	0	263	2.99
14	164	24	9	0	0	0	197	2.24
15	135	23	12	0	0	0	170	1.94
16	111	26	4	0	0	0	141	1.61
17	89	23	3	0	0	0	115	1.31
≥18	457	119	25	0	0	0	601	6.84
مجموع	4491	1511	2632	95	21	33	4491	100
درصد	51.13	17.20	29.97	1.08	0.24	0.38	100	

جدول ۲. توزیع موتیف/تکرارهای نشانگر SSR در ترنسکرپتوم عدس تحت تنش سرما با استفاده از سرهم‌سازی توالی‌های EST

تکرار	موتیف						مجموع	درصد
	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Hexa-		
5	0	0	24	-	-	-	24	14.29
6	0	4	4	-	-	-	8	4.76
7	0	1	2	-	-	-	3	1.79
8	0	4	1	-	-	-	5	2.98
9	0	1	1	-	-	-	2	1.19
10	25	0	1	-	-	-	26	15.48
11	10	0	0	-	-	-	10	5.95
12	8	1	0	-	-	-	9	5.36
13	8	1	0	-	-	-	9	5.36
14	8	0	0	-	-	-	8	4.76
15	3	0	0	-	-	-	3	1.79
16	3	0	0	-	-	-	3	1.79
17	2	1	0	-	-	-	3	1.79
18	9	0	0	-	-	-	9	5.36
19	13	0	0	-	-	-	13	7.74
20	5	0	0	-	-	-	5	2.98
21	2	0	0	-	-	-	2	1.19
22	5	1	0	-	-	-	6	3.57
≥23	29	3	0	-	-	-	31	11.9
مجموع	117	18	33	-	-	-	168	100
درصد	69.65	10.71	19.64	-	-	-	100	



شکل ۱. فراوانی موتیف/تکرارهای ریزماهوره شناسایی شده در ترنسکرپتوم عدس با استفاده از خوانش‌های کوتاه سرهم‌بندی شده



شکل ۲. فراوانی موتیف/تکرارهای ریزماهوره شناسایی شده در ترنسکرپتوم عدس با استفاده از سرهم‌سازی توالی‌های EST

(با حد آستانه $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$). همچنین نتایج بلاست یونی‌ژن‌های دارای نشانگر SSR علیه داده‌های پروتئینی یونجه یک‌ساله، نخود، سویا و آرابیدوپسیس در شکل‌های ۳ نشان داد که برخلاف کل یونی‌ژن‌ها، یونی‌ژن‌های دارای نشانگر SSR در

تفسیر کارکردی یونی‌ژن‌های حاوی ریزماهوره
نتایج بلاست یونی‌ژن‌های دارای نشانگر SSR علیه پایگاه داده‌های پروتئین‌های غیرتکراری (NR) نشان داد که از ۷۲۱۱ یونی‌ژن دارای SSR، ۵۸۳۴ یونی‌ژن (۸۰ درصد) دارای رکورد مشابه در پایگاه NR بودند

(GO:0044464) و اجزای سلولی (FDR: 0.0024) با ۴۶۳ ژن بیشترین میزان نشانگر را به خود اختصاص دادند. بیشترین موتیف تکرار شده ۱ تا ۶ نوکلئوتیدی در ژن‌های گروه کارکردی سلول و اجزای سلول، شامل 10(T)، 6(TC)، 5(CTT)، 5(GGAA)، 5(CTTCT) و 5(TTTTGG) بودند. مطالعات وسیع نشان می‌دهد که غشاء سلول، جایگاه اولیه صدمات سرمایی در گیاهان است (Xiong *et al.*, 2002). از این رو شناسایی و رسیدن به چارچوب مولکولی و تغییرات ژن‌های دخیل در این گروه کارکردی، نقش بسزایی در سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاحی مقاومت به سرما و معروفی ژن‌های کاندید دارد.

حوزه عملکرد مولکولی (MF) بیشترین میزان نشانگر را در خود جای داد. گروه کارکردی اتصال^۱ (GO: 0005488) و فعالیت‌های فروکافتی^۲ (GO: 0003824) در این حوزه بیشترین میزان نشانگر را در خود جای دادند. از بین دو گروه معرفی شده گروه کارکردی اتصال با ۲۲۸۵ یونی ژن (FDR: 0.00039) از نظر آماری معنی‌دار بود. در این گروه نیز موتیف‌های 10(A)، 6(TC)، 5(GAA)، 5(AGTG) و 5(CTTCT) بیشترین میزان تکرار را به خود اختصاص دادند. در پژوهش Gupta *et al.* (2016) همکاران (۲۰۱۶) نیز نتایج مشابهی حاصل شد، به طوری که گروه کارکردی اتصال چه در حالت کلی و چه در حالتی که تنها ژن‌های حاوی نشانگر EST-SSR در نظر گرفته شده بودند بیشتر فراوانی را در حوزه عملکرد مولکولی به خود اختصاص دادند (Gupta *et al.*, 2016). گروه کارکردی اتصال در اغلب تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌عنوان بزرگ‌ترین گروه غنی‌سازی شده شناسایی شده است (Yilmaz Temel *et al.*, 2015).

یونجه یک‌ساله کمترین مقدار رکورد را دارد (۸۳/۲۱ درصد). نخود، سویا و آرابیدوپسیس به ترتیب با بیشترین میزان شباهت را با این یونی ژن‌ها نشان دادند. با توجه به این که احتمال حضور نشانگر EST-SSRها در توالی 3' UTR و 5' UTR نوفاً بیشتر از توالی ترجمه شونده RNA است (Primmer, 2009) و از طرف دیگر نواحی 3' UTR و 5' UTR در عدس و یونجه یک‌ساله چه از نظر طول و چه از نظر توالی اختلاف بیشتری دارند (Sudheesh *et al.*, 2016) از این رو نواحی رونویسی شده‌ی غیرترجمه‌ای، محلی است که بیشترین احتمال حضور نشانگر EST-SSR در آنجا قابل تصور است.

از ۷۲۱۱ یونی ژن دارای SSR، ۲۲۲۵ (۳۸ درصد از توالی بلاست شده) مستندسازی شدند و گروه‌بندی آن‌ها در سه وضعیت فرآیند زیستی (BP)، اجزای سلولی (CC) و عملکرد مولکولی (MF) در شکل ۴ نشان داده شد. نتایج آزمون فیشر و نمودار تفسیر هستی‌شناسی اینترنتی AgriGO نشان داد که در حوزه فرآیند زیستی، زیرگروه‌های فرآیندهای سلولی (GO:0009987) بیشترین تعداد EST-SSR را شامل شد. در گروه کارکردی فرآیند زیستی ۱۲۱۱ یونی ژن دارای نشانگر قرار گرفت و تنها گروهی بود که نسبت به ژنوم رفرنس موجود، طبق آزمون فیشر غنی‌سازی شده بود (FDR: $5.6e^{-05}$). بیشترین موتیف تکرار شده ۱-۶ نوکلئوتیدی در این گروه از ژن‌ها شامل 10(A)، 6(AG)، 5(CTT)، 5(AGTG)، 5(AGAGA) و 5(ATTGGG) بود. فراوانی تخصیص عبارت‌های GO مرتبط به فرآیند متابولیکی به توالی‌های تک ژن حاوی تکرارهای ریزماهواره می‌تواند در شناسایی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط به بیان ژن‌ها و تولید و کنترل متابولیت‌ها به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه‌ای که در تحمل به تنش‌های زیستی نقش حیاتی دارند، کمک نماید (Kaplan *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2013). در حوزه اجزای سلولی (CC)، گروه کارکردی سلول (GO:0005623)

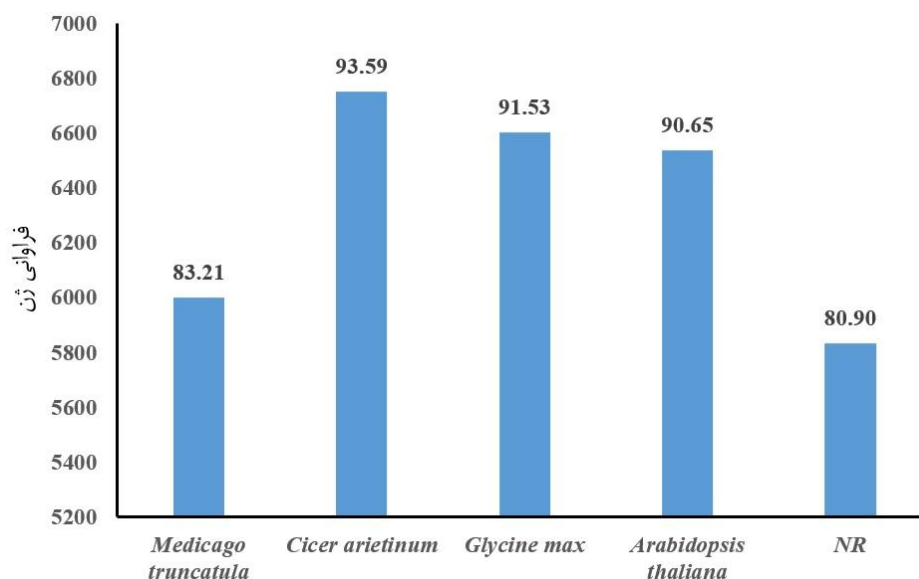
1. Binding

2. Catalytic activity

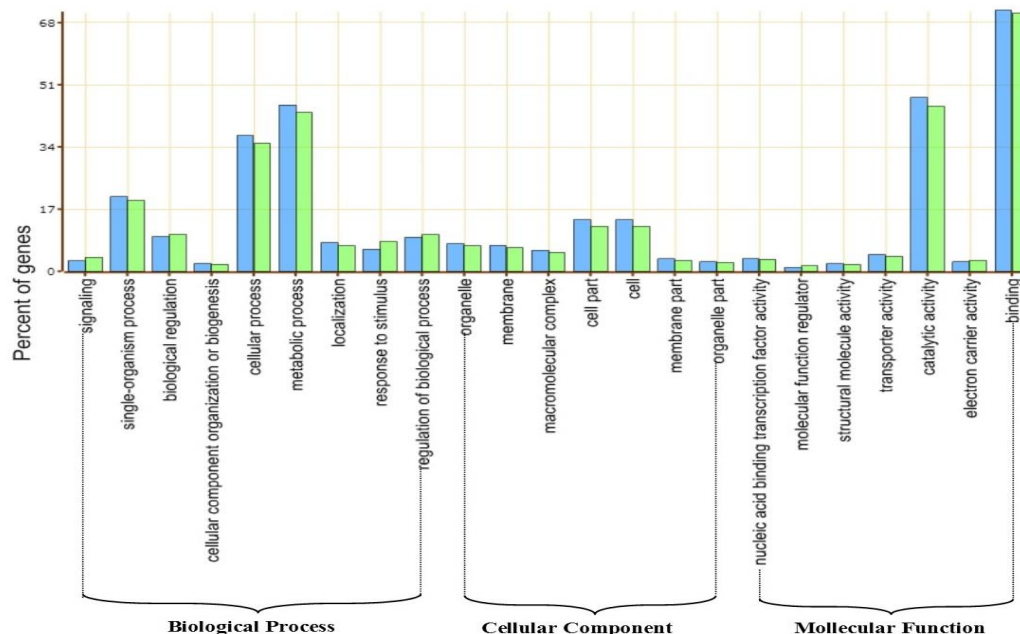
اغلب این مشکلات به دلیل کمبود محتوای ژنتیکی برای این گیاه می‌باشد؛ از این رو در مسیر فائق آمدن به مشکلات برنامه‌های اصلاحی عدس، فناوری NGS با ایجاد بستری مناسب جهت تهیه نقشه‌های ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی در مقیاس وسیع، نقش مهمی ایفا می‌نماید. سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه، با پوشش بیشتر ترنسکرپتوم گیاه نسبت به داده‌های EST، موجب افزایش تعداد نشانگرهای شناسایی شده، از ۱۶۸ مکان ریزماهواره در EST به ۸۹۰۵ مکان ریزماهواره در فرآیند توالی‌یابی شد.

شناسایی نشانگرهای EST-SSR در ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش سرما در غربال و گروه‌بندی ارقام مقاوم و حساس مؤثر بوده و انتخاب والدین مناسب برای برنامه‌های اصلاحی که به‌منظور تولید ارقام متحمل به تنش سرما طرح‌ریزی شده‌اند را تسهیل می‌نماید (Wang *et al.*, 2017a). همچنین به‌دلیل توارث‌پذیری و محافظت‌شدگی بالای این توالی‌ها می‌توان از پتانسیل آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی گونه‌های نزدیک به عدس نیز استفاده نمود.

عدس زراعی در بین حبوبات دانه‌ای با چالش‌های بیشتری در زمینه برنامه‌های اصلاحی روبرو بوده که



شکل ۳. نتایج BLASTx یونی‌ژن‌های عدس دارای نشانگر SSR علیه داده‌های پروتئینی NR، یونجه یک‌ساله، نخود، سویا و آرابیدوپسیس. اعداد روی هر ستون درصد شباهت آن پایگاه داده را با یونی‌ژن‌های شامل نشانگر EST-SSR در عدس را نشان می‌دهد.



شکل ۴. نمودار دسته‌بندی کارکردی یونی‌ژن‌های حاوی ریزماهواره

آن‌ها نواحی UTR می‌باشند، از این‌رو بررسی این نواحی در رونوشت ژن‌های کاندید پاسخ‌دهنده به تنش سرما از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد. در نهایت می‌توان گفت با توسعه نشانگرهای EST-SSR فرآیند غربال و گروه‌بندی ارقام متحمل به سرما و مکانیسم تغییرات ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش تسهیل می‌شود و راهی سریع و ارزان برای افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی که به‌منظور معرفی ارقام مقاوم به تنش سرما طراحی شده‌اند، باز خواهد گردید.

با این وجود مقایسه هر دو سری داده ترنسکریپتومی، از نظر نوع و تعداد موتیف‌های شناسایی شده نتایج مشابهی را به‌همراه داشت. موتیف‌های سه نوکلئوتیدی با توجه به خصوصیتی همچون عدم تغییر در قاب خوانش باز و توارث بین‌گونه‌ای بالاتر، گزینه‌های مناسبی برای بررسی‌های ژنتیکی در عدس و گونه‌های نزدیک به آن شناخته شدند. همچنین با توجه به نتایج می‌توان چنین اظهار نمود که اغلب نشانگرهای شناسایی شده در ژن‌هایی قرار داشتند که نقش مهمی در پاسخ به تنش سرما دارند و جایگاه احتمالی اغلب

REFERENCES

- Alisoltani A, Ebrahimi S, Azarian S, Hematyar M, Shiran B, Jahanbazi H, Fallahi H, Mousavi-Fard S, Rafiei F (2016) Parallel consideration of SSRs and differentially expressed genes under abiotic stress for targeted development of functional markers in almond and related *Prunus* species. *Sci. Hortic.* 198: 462-472.
- Al-Quraan NA, Ghunaim AI, Alkhatib RQ (2015) The influence of chlorsulfuron herbicide on GABA metabolism and oxidative damage in lentil (*Lens culinaris Medik*) and wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 37: 227.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman, DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Alves-Carvalho S, Aubert G, Carrère S, Cruaud C, Brochot AL, Jacquin F, Klein A, Martin C, Boucherot K, Kreplak J (2015) Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *Plant J.* 84: 1-19.

- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
- Barrios A, Caminero C, García P, Krezdorn N, Hoffmeier K, Winter P, Pérez de la Vega M (2017) Deep Super-SAGE transcriptomic analysis of cold acclimation in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *BMC Plant Biol.* 17: 111.
- Buchwaldt L, Anderson KL, Morrall RAA, Gossen BD, Bernier CC (2004) Identification of Lentil Germ Plasm Resistant to *Colletotrichum truncatum* and Characterization of Two Pathogen Races. *Phytopathology.* 94: 236-243.
- Chen J, Li R, Xia Y, Bai G, Guo P, Wang Z, Zhang H, Siddique KHM (2017) Development of EST-SSR markers in flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee) based on de novo transcriptomic assemblies. *PLoS One.* 12(9): e0184736.
- Dai Y, Su W, Yang C, Song B, Li Y, Fu Y (2017) Development of Novel Polymorphic EST-SSR Markers in Bailinggu (*Pleurotus tuoliensis*) for Crossbreeding. *Genes,* 8: 325.
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res,* 38: 64-70.
- Erskine W (2009) *The Lentil: Botany, Production and Uses*, CABI, Wallingford, Oxfordshire.
- Gupta DS, Cheng P, Sablok G, Thavarajah P, Coyne CJ, Kumar S, Baum M, McGee RJ (2016) Development of a panel of unigene-derived polymorphic EST-SSR markers in lentil using public database information. *Crop. J,* 4: 425-433.
- Hamwiah A, Udupa SM, Sarker A, Jung C, Baum M (2009) Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils. *Breed. Sci,* 59: 77-86.
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant J.* 50: 967-981.
- Kaur S, Cogan NOI, Pembleton LW, Shinozuka M, Savin KW, Materne M, Forster JW (2011) Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. *BMC Genomics.* 12:265
- Khazaei H, Caron CT, Fedoruk M, Diapari M, Vandenberg A, Coyne CJ, McGee R, Bett KE (2016) Genetic diversity of cultivated lentil (*Lens culinaris* Medik.) and its relation to the world's agro-ecological zones. *Front. Plant Sci.* 7:1093.
- Kumar S, Barpete S, Kumar J, Gupta P, Sarker A (2013) Global lentil production: constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra-Ann Tech.* 17: 1-13.
- Kumar S, Hamwiah A, Manickavelu A, Kumar J, Sharma T, Baum M (2014) Advances in lentil genomics. In: Gupta S, Nadarajan N, Gupta D S (eds) *Legumes in the Omic Era*, Springer, New York. pp 111-130.
- Long Y, Zhang J, Tian X, Wu S, Zhang Q, Zhang J, Dang Z, Pei XW (2014) De novo assembly of the desert tree *Haloxylon ammodendron* (C. A. Mey.) based on RNA-Seq data provides insight into drought response, gene discovery and marker identification. *BMC Genomics.* 15:1111.
- Luro FL, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008) Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics.* 9:287.
- Majnoon Hosseini N (2008) *Legumes in Iran*. Jihad Daneshgahi Press, Tehran.
- Pérez-de-Castro AM, Vilanova S, Cañizares J, Pascual L, Blanca JM, Díez MJ, Prohens J, Picó B (2012) Application of genomic tools in plant breeding. *Curr. Genomics.* 13: 179-195.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1: 215-222.
- Primmer CR (2009) From conservation genetics to conservation genomics. *Ann. Ny. Acad. Sci.,* 1162: 357-368.
- Sabaghpour S, Seyedi F, Mahmoodi A, Safikhani M, Pezeshkpour P, Rostemi B, Kamel M, Ferayedi Y, Alahyari N,

- Poursiabidi M (2013) Cultivar release: kimiya, a new high yielding lentil cultivar for moderate cold and semi warm climate of iran. *Seed. Palt. Improve J.* 29: 397-399.
- Saha GC, Vandemark GJ (2013) Stability of Expression of Reference Genes Among Different Lentil (*Lens culinaris*) Genotypes Subjected to Cold Stress, White Mold Disease, and Aphanomyces Root Rot. *Plant Mol. Biol. Report.*, 31: 1109-1115.
- Singh D, Singh CK, Taunk J, Tomar RSS, Chaturvedi AK, Gaikwad K, Pal M (2017) Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC Genomics.* 18:206.
- Srivastava R, Vasishtha H (2012) Saponins and lectins of Indian chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils (*Lens culinaris*). *Indian J. Agric. Biochem.* 25: 44-47.
- Sudheesh S, Verma P, Forster JW, Cogan NOI, Kaur S (2016) Generation and characterisation of a reference transcriptome for lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Int. J. Mol. Sci.* 17(11): 1887.
- Sultana R, Choudhary AK, Pal AK, Saxena KB, Prasad BD, Singh R (2014) Abiotic Stresses in Major Pulses: Current Status and Strategies. Springer, New Delhi.
- Thiel T, Michalek W, Varshney R, Graner A (2003) Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Gent.* 106: 411-422.
- Tian DQ, Pan XY, Yu YM, Wang WY, Zhang F, Ge YY, Shen XL, Shen FQ, Liu XJ (2013) De novo characterization of the Anthurium transcriptome and analysis of its digital gene expression under cold stress. *BMC Genomics.* 14(1): 827.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23: 48-55.
- Varshney RK, Tuberosa R (2007) *Genomics-Assisted Crop Improvement.* Springer, Netherlands.
- Verma P, Shah N, Bhatia S (2013) Development of an expressed gene catalogue and molecular markers from the de novo assembly of short sequence reads of the lentil (*Lens culinaris* Medik.) transcriptome. *Plant Biotechnol. J.* 11: 894-905.
- Wang P, Yang L, Zhang E, Qin Z, Wang H, Liao Y, Wang X, Gao L (2017a) Characterization and development of EST-SSR markers from a cold-stressed transcriptome of centipedegrass by Illumina paired-end sequencing. *Plant Mol. Biol. Rep.* 35: 215-223.
- Wang S, Zhou G, Huang X, Hu J, Wang B, Lin C, Li X, Jia Y, Wang A (2017b) Transcriptome analysis of non-heading Chinese cabbage under heat stress by RNA-seq and marker identification. *Euphytica.* 213:109.
- Wang Z, Li, J Luo Z, Huang L, Chen X, Fang B, Li Y, Chen J, Zhang X (2011) Characterization and development of EST-derived SSR markers in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *BMC Plant Biol.* 11:139.
- Wu R, Wang T, Warren BAW, Allan AC, Macknight RC, Varkonyi-Gasic E (2017) Kiwifruit SVP2 gene prevents premature budbreak during dormancy. *J. Exp. Bot.* 68: 1071-1082.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* 14: 165-183.
- Xu X, Zhou C, Zhang Y, Zhang W, Gan X, Zhang H, Guo Y, Gan S (2018) A novel set of 223 EST-SSR markers in Casuarina L. ex Adans. polymorphisms, cross-species transferability, and utility for commercial clone genotyping. *Tree Genet. Genomes.* 14: 30.
- Yilmaz Temel H, Göl D, Kaya Akkale HB, Kahrman A, Tanyolaç MB (2015) Single nucleotide polymorphism discovery through illumina-based transcriptome sequencing and mapping in lentil. *Turk. J. Agric. For.* 39: 470-488.
- Zheng X, Pan C, Diao Y, You Y, Yang C, Hu Z (2013) Development of microsatellite markers by transcriptome sequencing in two species of Amorphophallus (*Araceae*). *BMC Genomics.* 14:490.