

توسعه نشانگرهای ریزماهوره EST-SSR مرتبط با تحمل به تنش خشکی در عدس (*Lens culinaris*)

سیده زهرا حسینی^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳، حسین فلاحی^۴، عبدالحسین رضایی نژاد^۵

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.

۵. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۷)

Development of EST-SSR Microsatellite Markers Related to Drought Tolerance in Lentil (*Lens culinaris*)

Seydeh Zahra Hosseini¹, Ahmad Ismaili^{2*}, Farhad Nazarian Firouz-Abadi³, Hossein Fallahi⁴, Abdolhossein Rezaeinejad⁵

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.

5. Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

(Received: Apr. 8, 2018 - Accepted: Oct. 29, 2018)

Abstract

Lentil (*Lens culinaris*) is one of the important grain legumes in feeding (as protein-rich food) and industry (such as biopolymer industry) and the problem of lower yield of this plant in Iran rather than average global yield is affected by exposure of plant to environmental stresses especially drought. Identification of molecular markers that closely linked to drought resistant genes help to implementation of breeding programs aimed at the production of drought tolerant plants. The goal of this study was identification of EST-SSR markers which closely linked to the genes involved in drought resistance and use of these information in identification of drought resistant genotypes in breeding programs. PEG was used for stress treatment, and after conduction of treatments, leaf samples were collected. Total RNA was extracted and cDNA libraries were sequenced. Results showed that 10546 (16%) of uni-genes contained at least one EST-SSR and about 27.5% of these sequences were annotated. Among different SSR motif-classes, tri-nucleotide repeats (46.03%) were the most abundant followed by mono-nucleotide repeats (37.25%) and di-nucleotide repeats (15.18%). The results of the functional annotation of these sequences, showed that the highest number of EST-SSRs were belonged to subgroups of binding (872), catalytic activity (806), metabolic processes (755), and cell components (651), respectively. The results showed that genes associated with these markers, involved in important biological functions and are an appropriate tool for study the genes involved in tolerance to stresses including drought stress.

Keywords: Drought stress, EST-SSR, Lentil, Marker.

چکیده

عدس یکی از لگوم‌های دانه‌ای مهم از نظر غذایی (به عنوان منبع غنی از پروتئین) و صنعتی (مثل صنعت بیوپلیمر) است و عملکرد پایین این گیاه در ایران نسبت به متوسط جهانی متأثر از تنش‌های محیطی به‌ویژه خشکی است. شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های دخیل در مقاومت به خشکی در ژنوم گیاه می‌تواند به‌نژادگران را در انجام برنامه‌های اصلاحی گیاهان مقاوم به خشکی کمک نماید. در این مطالعه هدف شناسایی نشانگرهای EST-SSR پیوسته با ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی بود که امید می‌رود که از این اطلاعات به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی در برنامه‌های به‌نژادی بهره برد. جهت اعمال تنش از پلی‌اتیلن‌گلیکول استفاده شد و پس از پایان تنش نمونه‌گیری از بافت برگ انجام شد. سپس RNA کل استخراج و کتابخانه‌های cDNA مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد ۱۰۵۴۶ (۱۶ درصد) از یونی‌ژن‌ها حداقل یک توالی EST-SSR را دارا بودند و حدود ۲۷/۵ درصد از این یونی‌ژن‌ها مستندسازی و در نهایت برای آنها رابطه هستی‌شناسی تعیین شد. بیشترین نشانگرها به ترتیب مربوط به تکرارهای ۳، ۱ و ۲ نوکلئوتیدی (با فراوانی ۴۶/۰۳، ۳۷/۲۵ و ۱۵/۱۸ درصد) بودند. نتایج مستندسازی کارکردی این یونی‌ژن‌ها نشان داد که بیشترین تعداد EST-SSRها به ترتیب به زیر گروه اتصال با ۸۷۲، زیرگروه فعالیت کاتالیتیکی با ۸۰۶ فرآیند متابولیکی با ۷۵۵ و بخش‌های سلول با ۶۵۱ یونی‌ژن اختصاص داشت. نتایج نشان داد که ژن‌های دارای این نشانگرها در اعمال حیاتی مهمی دخیل هستند و ابزار مناسبی برای مطالعه ژن‌های دخیل در تحمل به تنش‌ها از جمله تنش خشکی هستند.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، عدس، نشانگر، EST-SSR

مقدمه

امروزه علاوه بر اهمیت عدس در تأمین پروتئین مورد نیاز مردم کم‌درآمد در کشورهای در حال توسعه، این گیاه به دلیل داشتن ویژگی‌های مطلوب تغذیه‌ای در سطح جهانی مورد توجه قرار گرفته است. به عنوان مثال عدس منبع غذایی غنی از کربوهیدرات‌های پروبیوتیک است که باعث رشد و فعالیت باکتری‌های روده می‌شود. این باکتری‌های مفید، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه را ایجاد می‌کنند و با تغییر وضعیت جذب مواد از روده و کنترل عوامل بیماری‌زا باعث کاهش چاقی و بیماری‌های غیرواگیر می‌شود و این خصوصیات عدس را به ماده غذایی محبوب در رژیم‌های غذایی سالم تبدیل می‌کند (Siva et al., 2017). امروزه علاوه بر مصارف خوراکی، از آرد عدس در برخی صنایع مانند صنعت تولید بایوپلی‌مرها استفاده می‌شود (Aydogdu et al., 2018). افزایش تقاضا برای عدس سبب افزایش سطح زیر کشت و عملکرد جهانی این گیاه شده است (Kumar et al., 2013).

میانگین سطح زیر کشت عدس در ایران در دو دهه منتهی به سال ۱۳۹۲، ۲۲۴۷۴۰ هکتار بوده است (Sabaghpour et al., 2013) و پس از نخود دومین حبوبات کشور به‌شمار می‌رود با این حال میزان تولید عدس در ایران پاسخگوی نیاز کشور نبوده و بیش از ۵۰ درصد از عدس مورد نیاز کشور از طریق واردات تأمین می‌شود (Anonymus, 2012). استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، خراسان و لرستان به ترتیب رتبه اول تا چهارم سطح زیر کشت عدس را دارند. بیش از ۹۰ درصد سطح زیر کشت عدس در ایران به صورت دیم کشت می‌شود و متوسط عملکرد آن کمتر از متوسط جهانی است (Parsa and Bagheri, 2008; Sabaghpour et al., 2013) و اغلب در دوران رشد رویشی و انتهای فصل رشد با تنش کمبود آب مواجه می‌شود (Sarker and Erskine, 2006).

در مناطق نیمه‌خشک در کشورهای در حال توسعه، استقرار ضعیف گیاهچه به دلیل خشکی و کم‌آبایی یکی از مهم‌ترین مشکلات کشاورزی می‌باشد (Hoseini et al., 2006). عدس یک گیاه نسبتاً مقاوم به خشکی است (Reda, 2015) ولی نتایج مطالعات نشان می‌دهد که با وجود تحمل نسبی عدس نسبت به خشکی در بین حبوبات، کاهش رطوبت خاک به کمتر از ۵۰ درصد ظرفیت زراعی عامل مهمی در کاهش شاخص‌های مورفولوژیکی و عملکرد در این گیاه می‌باشد (Panahyan-e-Kivi et al., 2009; FAO, 2016).

تنوع ژنتیکی پایه‌های روش‌های به‌نژادی گیاهی است که با استفاده از نشانگرها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. دو مورد از مهم‌ترین و پرکاربردترین نشانگرهای مولکولی در مطالعات ژنتیکی جمعیت شامل genome-wide Simple Sequence Repeats (SSR) و Simple Sequence Repeats (SSR) است که توسط تکنیک‌های مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید تعیین شده‌اند (Meyer et al., 2017). نشانگر SSR یک نشانگر بسیار تکرارپذیر، چندآلی و دارای همبازری است و به‌طور یکنواخت و به مقدار کافی در سطح ژنوم توزیع شده است و چون دارای چندشکلی بالایی است، اطلاعات زیادی تولید می‌کند. همچنین تجزیه و تحلیل نشانگر SSR به‌طور نظری و عملی به‌خوبی شناخته شده و نمره‌دهی آسان نشانگرهای SSR، این نشانگر را به یک نشانگر مفید تبدیل کرده است (Gupta and Varshney, 2000; Li et al., 2016; Guichoux, 2011). بعضی از محدودیت‌های نشانگر SSR شامل الگوهای جهش پیچیده و احتمال وجود هموپلاستی و آل‌های نهفته است (Putman and Carbone, 2014).

نشانگرهای EST-SSR ریزماهورهایی هستند که روی قطعات کدکننده ژن قرار گرفته‌اند و ممکن است با نواحی عملکردی مرتبط باشند و می‌توانند در ارزیابی تکامل ژنی که روی آن قرار دارند، کمک

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و اعمال تنش

بذر عدس (رقم گچساران) از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (ایستگاه گچساران) تهیه و در گلدان‌های حاوی شن، ورمیکولیت و پیت موس با نسبت‌های مساوی کشت شدند (در هر گلدان سه بذر به‌طور مستقیم کاشته شد). گلدان‌ها به اتاق کشت با شرایط شدت نوری ۱۴۰۰-۱۲۰۰ لوکس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. گلدان‌ها تا زمان جوانه زدن بذور با آب و بعد از آن تا زمان اعمال تنش، آبیاری و تغذیه با محلول نیمه‌هولگند انجام شد. با توجه به اینکه در مناطق نیمه‌خشک (مانند اغلب مناطقی که در ایران به کشت حبوبات دیم اختصاص داده می‌شود)، استقرار ضعیف گیاهچه به دلیل خشکی یا کم‌آبایی ابتدای فصل یکی از مهم‌ترین مشکلات کشاورزی است (Hoseini *et al.*, 2006)، از این‌رو در این تحقیق گیاهچه‌های ۲۱ روزه به منظور اعمال تنش خشکی انتخاب شدند. به منظور اعمال تنش خشکی آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار تنش و شاهد و ۴ تکرار انجام شد که هر تکرار شامل ۵ گلدان بود. بعد از جوانه‌زدن بذور، گیاهچه‌ها به دو گروه تقسیم شدند. گیاهان گروه اول (به‌عنوان تیمار شاهد) با محلول نیمه‌هولگند تا رسیدن به ظرفیت زراعی مزرعه آبیاری و تغذیه شدند. گیاهان گروه دوم (به‌عنوان تیمار خشکی) به مدت سه روز (هر روز یک بار) با محلول نیمه‌هولگند حاوی ۲۰ درصد پلی اتیلن گلیکول PEG 6000 (polyethylene glycol 6000) آبیاری شدند. با توجه به اینکه در گیاه عدس حدود ۷۲ ساعت بعد از اعمال تنش خشکی، پاسخ‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی به طور معنی‌داری در گیاه مشاهده می‌شود (Muscolo *et al.*, 2014)، بر این اساس ۷۲ ساعت بعد از اولین آبیاری گلدان‌ها با PEG و با مشاهده اولین علائم تنش در گیاهچه‌ها،

کند. از طرفی حفاظت شده‌تر بودن نواحی بالا و پایین دست توالی EST-SSR، این نشانگر را در بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها نسبت به نشانگرهای ریزماهوری ژنومی کارآمدتر می‌سازد (Luro *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2018). با این وجود یکی از معایب EST-SSR چندشکلی پایین در آنهاست. یکی دیگر از محدودیت‌های این نشانگر محدود بودن منابع EST‌های موجود در پایگاه‌های داده است (Shafiee *et al.*, 2014). توالی‌یابی RNA^۱ یک روش مقرون‌به‌صرفه برای به‌دست آوردن تعداد زیادی توالی EST برای گیاهان غیرمدل است. در مطالعه Sathyanarayana و همکاران، از توالی‌یابی RNA گیاه باقلا مخملی (*Mucuna pruriens*) به‌منظور شناسایی نشانگرهای EST-SSR استفاده شد و تعداد ۷۴۹۳ نشانگر در ترانسکریپتوم آن شناسایی شد (Sathyanarayana *et al.*, 2017). در مطالعه ترانسکریپتوم گیاه خلر (*Lathyrus sativus* L.) تعداد ۳۲۰۴ نشانگرهای EST-SSR شناسایی شد (Hao *et al.*, 2017). در مطالعه Chen و همکاران از توالی‌یابی RNA گیاه ماش (*Vigna radiata* L.) به منظور شناسایی نشانگرهای EST-SSR استفاده شد و تعداد ۱۳۱۳۴ EST-SSR شناسایی شد (Chen *et al.*, 2015a). بنابراین داده‌های به‌دست‌آمده از توالی‌یابی RNA می‌تواند منبع خوبی برای شناسایی مکان‌های EST-SSR باشد و سبب رفع محدودیت این نشانگر شود. از این‌رو در این تحقیق از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA عدس در شرایط تنش خشکی به منظور دستیابی به EST-SSR‌های پیوسته با ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی استفاده شده است.

^۱RNA sequencing

سرهم‌بندی نوپدید (*de novo assembly*) خوانش‌های دارای کیفیت مناسب (دارای میانگین Phred score معادل ۳۰ و بالاتر از آن و فاقد آدپتور و نوکلئوتیدهای N بودند) با استفاده از نرم‌افزار Trinity (Trinity trinityrnaseq_r2012-05-18;) (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net>) با پارامترهای پیش فرض (مانند طول k-mer مساوی ۲۵) انجام شد. به منظور حذف کانتیگ‌های تکراری (انتخاب بلندترین کانتیگ از بین کانتیگ‌هایی که با یک پروتئین در NR همولوژی بالایی دارند و حذف بقیه کانتیگ‌ها) از مجموعه نرم‌افزاری Gene Evidential (V2013.07.27) استفاده شد. در نهایت ترانسکرپت‌های کوتاه‌تر از ۲۰۰bp (کانتیگ‌هایی که حدوداً طولی کمتر از مجموع طول دو خوانش دارند و ممکن است که به اشتباه سرهم شده باشند) حذف شدند (Alves Carvallho *et al.*, 2015).

شناسایی نشانگر EST-SSR

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از نرم‌افزار (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>) MISA انجام شد. حداقل تکرار برای نشانگرهای یک، دو، سه، چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی به ترتیب ۱۰، ۶، ۵، ۵، ۵ و ۵ مشخص شد و همچنین حداکثر فاصله بین دو مکان نشانگر روی یک توالی ۱۰۰bp تعیین شد (Dai *et al.*, 2017).

شناسایی کارکرد یونی‌ژن‌ها

به منظور شناسایی کارکرد و تفسیر عملکردی یونی‌ژن‌های حاوی نشانگر EST-SSR، رونوشت‌های حاوی این نشانگر با استفاده از نرم‌افزار (v2.6.0) NCBI Blast (Altschul *et al.*, 1997) در مقابل پایگاه داده توالی‌های پروتئینی غیرتکراری NCBI non-redundant (Nr) protein (sequences database) و داده‌های پروتئینی

برگ‌های کاملاً گسترده گیاهان برداشت و در ازت مایع قرار داده شد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA کل از هر نمونه، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ گیاهچه‌ها که با استفاده از هاون چینی و ازت مایع به خوبی پودر شده بود، استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از محلول تریزول (Trizol) طبق پروتکل شرکت سازنده (Invitrogen, life technology) انجام شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت و یکپارچگی RNA آن با استفاده از Bioanalyzer (Agilent, 2100) تعیین شد و نمونه‌های RNA دارای RIN (RNA Integrity Number) بالاتر از ۷ برای توالی‌یابی انتخاب شدند.

توالی‌یابی RNA

به منظور تعیین توالی قطعات RNA موجود در نمونه‌ها، ۴ کتابخانه‌های cDNA (دو کتابخانه از نمونه‌های شاهد و دو کتابخانه از نمونه‌های تنش) با استفاده از کیت Illumina (San Technologies, Diego, CA) مطابق با روش پیشنهادی شرکت سازنده، سنتز شدند. در نهایت از پلتفرم Illumina HiSeq2500 برای توالی‌یابی کتابخانه‌ها استفاده شد. قطعات از دو طرف و با طول ۱۵۰ جفت باز خوانش شدند.

کنترل کیفیت و سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه

خوانش‌های دارای کیفیت پایین که یا حاوی آدپتور بودند و یا میانگین Phred score کمتر از ۳۰ داشتند حذف شدند (Bokulich *et al.*, 2013).

جدول ۱. کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده از

نمونه‌های برگ گیاهان تحت تنش خشکی و شاهد			
RIN	غلظت (ng/ul)	تکرار	تیمار
۷/۴	۸۶۱	۱	خشکی
۷/۴	۵۰۵	۲	خشکی
۷	۶۰۹	۱	شاهد
۷	۹۹۸	۲	شاهد

در مجموع از توالی‌یابی ۴ کتابخانه cDNA تعداد ۱۹۴۴۶۰۸۱۸ خوانش به دست آمد که حدود ۶/۹ درصد از خوانش‌ها طی فرآیند تریم^۲ حذف شد. در نهایت ۱۸۰۹۵۶۰۹۶ (حدود ۹۳/۱ درصد) خوانش کوتاه با کیفیت مناسب باقی ماند که در ایجاد ترانس کریپتوم استفاده شد.

سرهم‌بندی نوپدید و حذف رونوشت‌های تکراری
در نتیجه سرهم‌بندی خوانش‌های دارای کیفیت مناسب تعداد ۷۸۴۳۲ رونوشت به دست آمد. بعد از حذف کانتیگ‌های تکراری (کانتیگ‌های دارای توصیف مشابه در پایگاه داده NR در NCBI) و کانتیگ‌هایی با طول کوتاه‌تر از ۲۰۰ bp تعداد ۶۵۰۱۳ رونوشت باقی ماند. طول کل ترانس کریپتوم ناشی از این سرهم‌بندی ۶۶/۱ Mbp است که با اندازه ترانس کریپتوم حاصل از سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه مربوط به بافت‌های مختلف عدس (۶۶/۷ Mbp) تقریباً برابر است (Sudheesh *et al.*, 2016) با توجه به اینکه توالی ژنوم عدس به طور کامل توالی‌یابی و مستند سازی نشده است، برای ارزیابی ترانس کریپتوم حاصل در این مطالعه، از مقایسه آن با سایر گیاهان دیپلوئید استفاده شد. مطالعه تعداد رونوشت در ترانس کریپتوم گیاهان دیپلوئید مدل و غیر مدل که توالی ژنوم آنها به طور

گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، یونجه یکساله (*Medicago truncatula*) و نخود (*Cicer arietinum*) از <https://www.phytozome.jgi.doe.go> با E-value $\leq 10^{-5}$ مورد Local BlastX قرار گرفت. آرابیدوپسیس یک گیاه مدل است که مطالعات ژنتیکی زیادی روی انجام شده و ژنوم آن تا حدود زیادی اشباع است. انتخاب یونجه یکساله و نخود به این دلیل صورت گرفت که میزان بالایی از شباهت ژن‌های ارتولوگ این دو گیاه با عدس گزارش شده است (Gujaria-Verma *et al.*, 2014). آنالیز غنی‌سازی روابط هستی‌شناسی ژن‌های (Gene Ontology(GO) Term enrichment) با هدف دسته‌بندی کارکرد ژن‌های حاوی نشانگر در روابط GO انجام شد. برای انجام این کار نتایج BlastX یونی ژن‌ها در برابر پایگاه داده NR به نرم‌افزار Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) منتقل شد تا با map شدن بر علیه GO Term ها، کارکرد آنها تعیین شود. از آزمون فیشر با حد آستانه $FDR \leq 0.05$ به منظور بررسی معنی‌داری GO Term های غنی‌سازی شده استفاده شد. از نرم‌افزار edgeR (بسته نرم‌افزاری R) برای شناسایی و تفسیر یونی ژن‌های عملکردی با بیان متفاوت استفاده شد.

نتایج و بحث

توالی‌یابی

جهت انجام توالی‌یابی، کیفیت نمونه‌ها بررسی شد و با توجه به اینکه نمونه‌های RNA دارای RIN بالاتر از ۷ بودند (جدول ۱)، این نمونه‌ها مورد توالی‌یابی قرار گرفتند.

EST-SSR را در ترانسکرپتوم ماش (*Vigna radiate* L.) نشان داد (Chen *et al.*, 2015a). با توجه به اینکه درصد نشانگرهای EST-SSR موجود در ترانسکرپتوم عدس نسبت به برخی از گیاهان زراعی مانند گندم (۷/۴۱ درصد)، جو (۲/۸ درصد) و شبدر (۷/۶۰ درصد) بیشتر است (Zheng *et al.*, 2013) ممکن است این افزایش به ساختار کلی ژنوم عدس مربوط باشد، چون این گیاه دارای ژنوم بزرگ (۴Gbp) است به طوری که حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد از کل ژنوم درون هسته‌ای عدس را توالی‌های تکراری تشکیل می‌دهد (Sudheesh *et al.*, 2016).

مطالعات زیادی توالی‌یابی ترانسکرپتوم و سرهم‌بندی توالی‌های کوتاه حاصل از آن را روشی کارآمد برای گسترش نشانگرهای مولکولی معرفی کرده‌اند (Zheng *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015a). همچنین مطالعاتی که به منظور گسترش نشانگر EST-SSR در گیاهانی که توالی ژنومی آنها به طور کامل تعیین نشده، انجام شده است نیز کارآمدی این روش در شناسایی نشانگرها در ترانسکرپتوم حاصل از سرهم‌بندی نوپدید این گیاهان را تأیید می‌کند (Chen *et al.*, 2015a; Harmon *et al.*, 2017). موتیف‌های تک نوکلئوتیدی (مونو) فراوانی ۳۷/۲۵ درصد را در بین نشانگرهای شناسایی شده دارا بودند (جدول ۲). در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۵) در بین نشانگر EST-SSR شناسایی شده در ماش (*Vigna radiate* L.) با استفاده از ترانسکرپتوم نوپدید، فراوانی موتیف‌های تک نوکلئوتیدی ۳۶/۲ درصد بود (Chen *et al.*, 2015a) و در بین موتیف‌های تک نوکلئوتیدی فراوانی A/T حدود ۹۶/۷ درصد بود. در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۵) بر روی لوبیای آزوکی (*Vigna angularis*) نیز فراوانی A/T حدود ۹۹ درصد موتیف‌های تک‌نوکلئوتیدی را شامل شده است (Chen *et al.*, 2015b).

موتیف‌های دو نوکلئوتیدی فراوانی ۱۵/۱۸ درصد را در بین نشانگرهای شناسایی شده دارا بودند (جدول ۲).

کامل توالی‌یابی شده است نشان می‌دهد که تعداد ژن در گیاهان دیپلوئید بین ۲۵۵۳۲ در یونجه یکساله (*Medicago truncatula*) و ۶۲۳۸۸ در براکیپودیوم (*Brachypodium distachyon* L.) متغیر است. تعداد رونوشت‌ها در این مطالعه نیز در این محدوده قرار دارد. نتایج بلاست رونوشت‌های حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه در مطالعه حاضر علیه پایگاه NR نشان داد که ۷۷ درصد از رونوشت‌ها با حد آستانه $E\text{-value} \leq 10.0 \times 10^{-5}$ دارای رکورد در پایگاه NR بودند. نتایج مطالعه Sudheesh و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که ترانسکرپتوم حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه از بافت‌های مختلف عدس نیز ۷۱ درصد با پایگاه NR تطابق دارد (Sudheesh *et al.*, 2016). با توجه به اینکه تعداد کمی یونی‌ژن (تنها ۲۴۶۹) در پایگاه داده NCBI برای عدس ثبت شده است، بررسی دقیق رونوشت‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند در تولید اطلاعات بیشتر در مورد ترانسکرپتوم عدس مؤثر باشد.

شناسایی نشانگرهای EST-SSR

از بین یونی‌ژن‌های حاصل از سرهم‌بندی نوپدید تعداد ۱۰۵۴۶ (۱۶ درصد) یونی‌ژن دارای EST-SSR بودند. از این تعداد، ۷۱۷۵ (۶۸/۰۵ درصد) یونی‌ژن فقط حاوی یک EST-SSR بودند، ۲۱۳۶ (۲۰/۲۵ درصد) از یونی‌ژن‌ها دارای بیش از یک EST-SSR و ۱۲۳۵ (۱۱/۷ درصد) یونی‌ژن دارای موتیف‌های ترکیبی (دو موتیف تکراری پشت‌سرهم مانند 12(TC)43(C)) بودند و در مجموع تعداد ۱۳۴۰۹ مورد EST-SSR شناسایی شد و فراوانی آن یک نشانگر به ازای هر ۴/۹ kb طول ترانسکرپتوم بود. نتایج مطالعه Singh و همکاران (۲۰۱۷) وجود ۹۹۴۹ نشانگر EST-SSR را در ترانسکرپتوم عدس (*Lens culinaris* Medikus) نشان داد (Singh *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۵) وجود ۱۰۰۵۳ (۲۰/۶ درصد) رونوشت دارای نشانگر

سه نوکلئوتیدی ۴۶/۰۳ درصد است و بیشترین فراوانی را در بین نشانگرهای شناسایی شده دارا است و فراوانی CCG/CGG حدود ۳۷/۴ درصد موتیف‌های سه نوکلئوتیدی را شامل شده است (جدول ۲). در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۵) بر روی لوبیا آزوکی (*Vigna angularis*) نیز فراوانی موتیف‌های سه نوکلئوتیدی ۳۹/۸ بود و بیشترین فراوانی را دارا بوده است (Chen et al., 2015b). در مورد فراوانی موتیف سه نوکلئوتیدی گزارشات متفاوتی در مقالات وجود دارد. نتایج مطالعه نشانگر EST-SSR بر روی نوعی چاودار وحشی (*Elymus sibiricus* L.) نتایجی مشابه نتایج مطالعه حاضر داشت و توالی CCG/CGG بیشترین فراوانی (۳۳/۴) را در بین توالی‌های ۳ نوکلئوتیدی و بیشترین موتیف در بین تمام EST-SSRها بود (Zhou, et al., 2016). نتایج مشابهی در مطالعه فراوانی EST-SSR در ارزن باتلاقی (*Seashore paspalum*) گزارش شده است (Jia et al., 2015).

فراوانی موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۹۷، ۰/۲۶ و ۰/۳ درصد بود. با توجه به اینکه با افزایش طول توالی امکان تکرار آن در ژنوم کاهش می‌یابد، کم بودن فراوانی این موتیف‌ها مورد انتظار بوده و نتایج سایر مطالعات نیز این نتایج را تأیید می‌کنند (Chen et al., 2015a; Chen et al., 2015b). بیشترین فراوانی موتیف چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی به ترتیب به AAAT/ATTT، AAGAG/CTCTT و AAGAGG/CCTCTT مربوط است.

به منظور مقایسه فراوانی نشانگرهای EST-SSR در ترنسکرپتوم عدس، حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه، در مطالعه حاضر با فراوانی این نشانگرها در رونوشت‌های حاصل از سرهم‌بندی توالی‌های EST به دست آمده از پایگاه داده NCBI، فراوانی این نشانگرها در جدول ۳ ارائه شد. نتایج نشان داد که ۱۰۱۹۰ EST عدس در ۱۱۳۰ توالی اسمبل

در مطالعه Chen و همکاران (2015a) در بین نشانگر EST-SSR شناسایی شده در ماش (*Vigna radiate* L.) با استفاده از ترانسکرپتوم نوپدید، فراوانی موتیف‌های دو نوکلئوتیدی ۱۳/۸ درصد بود (Chen et al., 2015a). در بین موتیف‌های دو نوکلئوتیدی فراوانی AG/CT حدود ۷۰/۸ درصد بود. در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۵b) بر روی لوبیا آزوکی (*Vigna angularis*) نیز فراوانی AG/CT حدود ۶۹ درصد از موتیف‌های دو نوکلئوتیدی را شامل شده است (Chen et al., 2015b). در نتایج مطالعه Chen و همکاران (2015a) بر روی ماش (*Vigna angularis*) نیز بیشترین فراوانی در بین موتیف‌های دو نوکلئوتیدی مربوط به AG/CT است (Chen et al., 2015a). در مطالعه Gupta و همکاران (۲۰۱۶) بر روی نشانگر EST-SSR در عدس، تعداد موتیف AG/CT بیشترین فراوانی را در بین نشانگرهای دو نوکلئوتیدی دارد (Gupt et al., 2016). مطالعات نشان داده است که موتیف AG در 5'UTR فراوانی بالایی دارد (Morgante et al., 2002; Mun et al., 2006) احتمالاً در تنظیم بیان ژن نقش دارد (Zhang et al., 2004). توالی CT نیز در 5'UTR به طور فراوانی وجود دارد و ممکن است نقش مهمی در تنظیم بیان ژن داشته باشد (Jia et al., 2015; Wei et al., 2011). با وجود شباهت بالای عدس و یونجه یک‌ساله (*Medicago truncatula*) از نظر synteny، نواحی 3'UTR و 5'UTR در ژنوم این دو گیاه هم از نظر طول و هم از نظر توالی تفاوت زیادی دارند (Sudheesh et al., 2016) و ممکن است دلیل این تفاوت در ناحیه 5'UTR در عدس با یونجه یک‌ساله به دلیل وجود نشانگر EST-SSR با توالی تکراری AG/CT باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فراوانی موتیف‌های

منابع از بیان فراوانی نشانگرهای تک نوکلئوتیدی به‌دلیل خطای توالی‌یابی صرف‌نظر می‌شود (Fungtammasan *et al.*, 2015) و بیشتر به نسبت فراوانی بین توالی‌های نشانگر ۲ و ۳ نوکلئوتیدی اشاره می‌شود و با توجه به اینکه فراوانی نشانگرهای ۳ نوکلئوتیدی در هر دو منبع بیشتر از توالی ۲ نوکلئوتیدی است، نتایج بررسی نشانگر EST-SSR در این دو گروه داده‌های هم‌دیگر را تأیید می‌کنند.

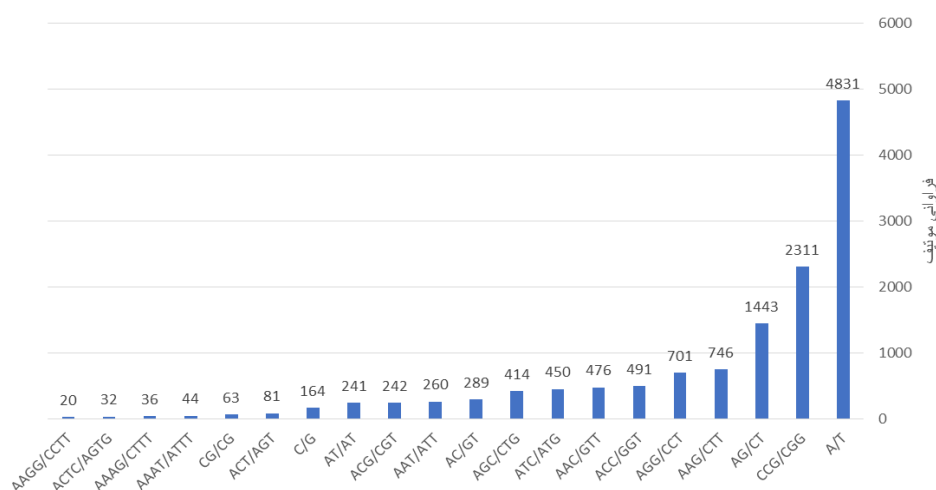
شدند که در ۱۷۸ توالی تعداد ۱۹۸ مکان نشانگر شناسایی شد. ۱۶ توالی بیش از ۱ مکان نشانگر و ۱۱ توالی دیگر نیز دارای نشانگر ترکیبی بودند. در کل بیشترین فراوانی موتیف‌های تک نوکلئوتیدی به موتیف A/T (تقریباً ۷۰ درصد کل نشانگرها) اختصاص یافت. حدود ۱۸/۱۸ درصد از توالی‌ها به نشانگرهای ۳ نوکلئوتیدی و ۱۱/۱۱ درصد نیز به نشانگرهای دو نوکلئوتیدی اختصاص داشت. با توجه به اینکه در اغلب

جدول ۲. توزیع نشانگر EST-SSR در ترانسکرپتوم عدس در شرایط تنش خشکی با استفاده از سرهم‌بندی نوپدید توالی‌های حاصل از توالی‌یابی RNA.

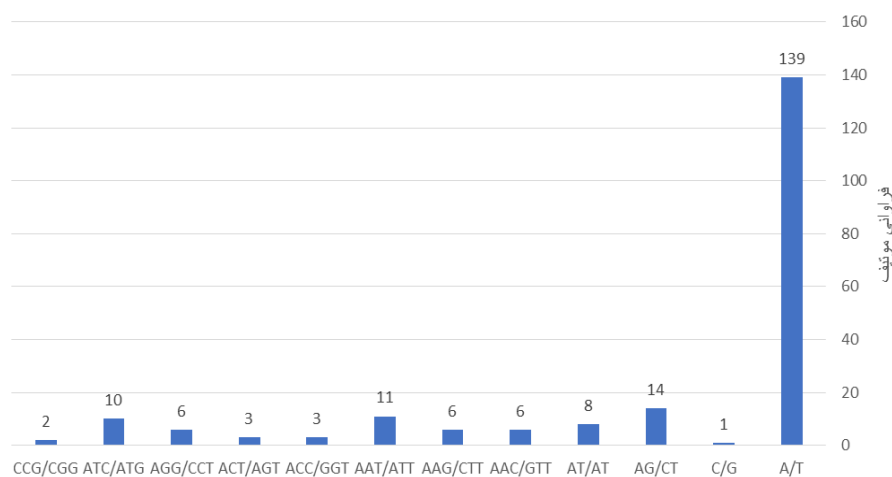
تعداد تکرار	موتیف						جمع	درصد
	۱ نوکلئوتیدی	۲ نوکلئوتیدی	۳ نوکلئوتیدی	۴ نوکلئوتیدی	۵ نوکلئوتیدی	۶ نوکلئوتیدی		
5	0	0	3557	101	30	31	3719	27.73
6	0	681	1538	20	5	7	2251	16.78
7	0	353	663	5		1	1022	7.62
8	0	223	186	1		0	410	3.06
9	0	196	91	1		1	289	2.15
10	2249	142	38	1		1	2431	18.13
11	855	59	24	0			938	6.99
12	465	35	16	0			516	3.85
13	269	24	13	0			306	2.28
14	183	21	9	0			213	1.59
15	148	17	9	0			174	1.3
16	106	28	4	1			139	1.03
17	96	23	5	0			124	0.9
18	75	24	4	0			103	0.77
19	59	22	4	0			85	0.63
≥20	490	188	11	0			689	5.14
جمع	4995	2036	6172	130	35	41	13409	100
درصد	37.25	15.18	46.03	0.97	0.26	0.305	100	

جدول ۳. توزیع نشانگر EST-SSR در ترانسکرپتوم عدس با استفاده از سرهم‌بندی توالی‌های EST موجود در پایگاه داده NCBI.

تکرار	موتیف						مجموع	درصد
	۱ نوکلئوتیدی	۲ نوکلئوتیدی	۳ نوکلئوتیدی	۴ نوکلئوتیدی	۵ نوکلئوتیدی	۶ نوکلئوتیدی		
5	0	0	28	-	-	-	24	12.12
6	0	5	4	-	-	-	8	4.04
7	0	1	1	-	-	-	3	1.5
8	0	3	1	-	-	-	5	2.5
9	0	2	1	-	-	-	2	1.01
10	25	0	1	-	-	-	26	13.13
11	10	0	0	-	-	-	10	5.05
12	13	1	0	-	-	-	9	4.5
13	6	1	0	-	-	-	9	4.5
14	13	1	0	-	-	-	8	4.04
15	4	0	0	-	-	-	3	1.5
16	4	0	0	-	-	-	3	1.5
17	2	1	0	-	-	-	3	1.5
18	13	0	0	-	-	-	9	4.5
19	17	0	0	-	-	-	13	6.56
20	3	0	0	-	-	-	5	2.52
21	4	0	0	-	-	-	2	1.01
22	6	1	0	-	-	-	6	3.03
≥23	20	6	0	-	-	-	31	15.65
مجموع	140	22	36	-	-	-	198	100
درصد	70.7	11.11	18.18	-	-	-	100	



شکل ۱. فراوانی موتیف‌های نشانگر EST-SSR شناسایی شده در ترانسکریپتوم عدس حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه.



شکل ۲. فراوانی موتیف‌های نشانگر EST-SSR شناسایی شده در ترانسکریپتوم عدس حاصل از سرهم‌بندی EST‌های به‌دست آمده از پایگاه داده NCBI.

به ازای هر ۵ kb برابر است (Pan *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). در برخی از منابع بیان شده است که میزان فراوانی این نشانگر با اندازه ژنوم گیاه دارای ارتباط است و با افزایش اندازه ژنوم، فراوانی نشانگر کاهش می‌یابد (Zhou *et al.*, 2016). با این حال، نتایج مطالعه فراوانی این نشانگر در خلر (*Lathyrus sativus* L.) که دارای ژنومی بزرگ با طول ۸/۲ Gbp است نشان داد که فراوانی آن یک نشانگر به‌ازای هر ۵/۷ kb است (Hao *et al.*, 2017). با توجه به این که فراوانی

در مطالعه حاضر ۱۳۴۰۹ نشانگر EST-SSR شناسایی شد. فراوانی نشانگرها در مطالعه حاضر، یک نشانگر به‌ازای هر ۴/۹ kb طول ترانسکریپتوم است که این فراوانی خیلی بیشتر از فراوانی گزارش شده در یونجه (*Medicago sativa*) با یک نشانگر به‌ازای هر ۱۲/۰۶ kb نیلوفر آبی (*Nilumbo nucifera*) با یک نشانگر به‌ازای هر ۱۳/۰۴ kb و سویا (*Glycine max*) با یک نشانگر به‌ازای هر ۷/۴kb است. در حالی که این فراوانی تقریباً با فراوانی گزارش شده در کرچک (*Ricinus communis* L.) با یک نشانگر

مستندسازی شدند و در سه وضعیت فرآیند زیستی؛ اجزای سلولی^۲ و عملکرد مولکولی^۳ گروه‌بندی شدند (شکل ۳).

نتایج آزمون فیشر و نمودار تفسیر هستی‌شناسی نشان داد که بیشترین تعداد EST-SSRها با تعداد ۱۶۰۴ در گروه عملکرد مولکولی قرار داشتند که زیر گروه اتصال (GO:0005488) با ۸۷۲ و زیرگروه فعالیت کاتالیتیکی (GO:0003824) با ۸۰۶ یونی‌ژن بیشترین یونی‌ژن‌های مربوط به گروه عملکرد مولکولی را شامل شدند. گروه فرآیند زیستی با ۱۱۵۷ یونی‌ژن کمترین تعداد یونی‌ژن‌ها را به خود اختصاص داد و زیرگروه فرآیند متابولیکی (GO:0008152) با ۷۵۵ یونی‌ژن بیشترین تعداد در بین زیرگروه‌های گروه فرآیند زیستی را به خود اختصاص داد. قرار گرفتن تعداد زیادی از یونی‌ژن‌ها در این زیرگروه می‌تواند سبب شناسایی نشانگرهای دارای همبستگی بالا با ژن‌های دخیل در متابولیسم شود که این امر می‌تواند در مطالعه متابولیت‌های ثانویه که در تنش‌ها و به ویژه تنش خشکی دخیل هستند مؤثر باشد (Tian *et al.*, 2013). تعداد ۱۲۵۵ یونی‌ژن در گروه اجزای سلول قرار گرفتند که زیرگروه سلول (GO:0005623) با ۶۷۰ یونی‌ژن و بخش‌های سلول (GO:0044464) با ۶۵۱ یونی‌ژن بیشترین یونی‌ژن‌های مربوط به این گروه را شامل شدند.

نتایج مطالعه نشانگرهای EST-SSR بر روی ماش نیز نشان داد که بیشترین نشانگرها به ژن‌هایی مربوط بودند که در زیرگروه‌های اتصال، فرآیند سلولی، فرآیند متابولیک، فعالیت کاتالیتیکی و اجزای سلول قرار داشتند (Chen *et al.*, 2015a) که این نتایج، نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند.

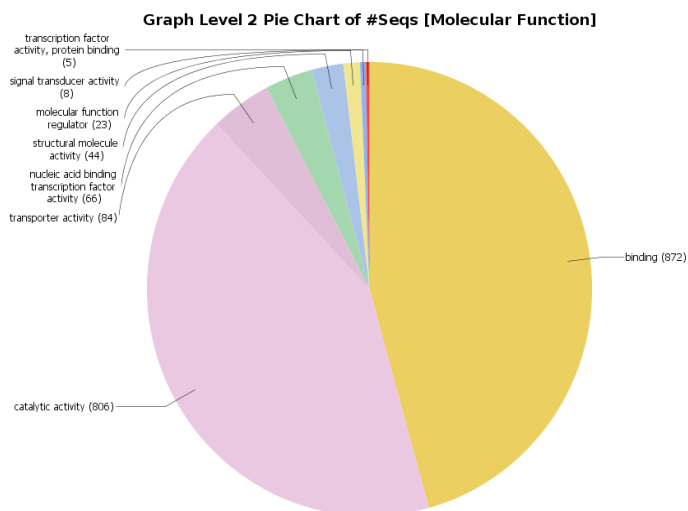
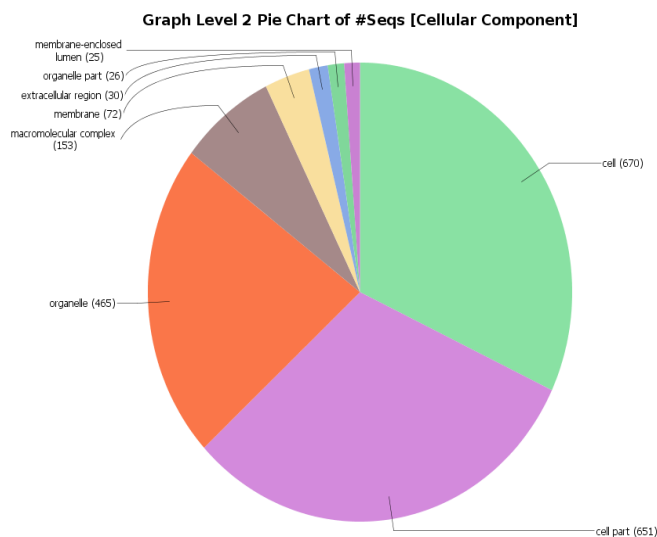
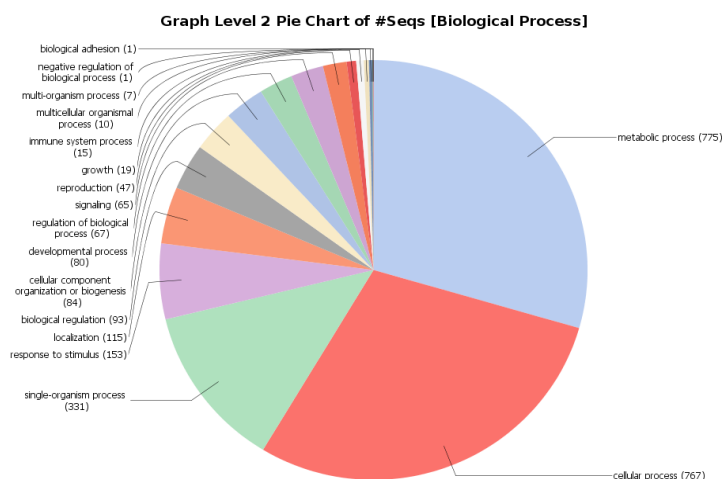
نشانگرها در کرچک که دارای ژنومی کوچک‌تر و خلر که دارای ژنومی بزرگتر از عدس هستند با فراوانی نشانگرهای شناسایی شده در عدس در تحقیق حاضر برابر است به نظر می‌رسد عوامل دیگری مانند سایر خصوصیات ژنومی، روش مطالعه، نرم‌افزارهای مورد استفاده در آنالیز این نشانگرها و ساختار ژنوم در تعیین میزان فراوانی این نشانگرها نقش دارند. با توجه به کاربرد این نشانگر در تعیین روابط فیلوژنی و تکمیل نقشه‌های ژنتیکی، بالا بودن فراوانی آنها در افزایش اطلاعات مربوط به ژنوم این گیاه مؤثر است. ضمناً بالا بودن تعداد این نشانگرها امکان پیدا کردن ژن‌های دارای نشانگر دخیل در پاسخ به تنش خشکی را افزایش می‌دهد.

تعیین کارکرد رونوشت‌های حاوی ریزماهوره

نتیجه بلاست رونوشت‌های دارای نشانگر EST-SSR علیه پایگاه داده‌های پروتئین‌های غیرتکراری (NR) با حد آستانه $E^{-5} \leq E\text{-value}$ نشان داد که از ۱۰۵۴۶ رونوشت دارای EST-SSR، ۸۵۱۵ مورد (۸۰/۰۷ درصد) دارای رکورد در پایگاه داده NR بودند. همچنین نتایج بلاست رونوشت‌های دارای نشانگر EST-SSR علیه داده‌های پروتئینی یونجه یک‌ساله (Medicago *truncatula*)، نخود (Cicer *arietinum*) و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) نشان داد که فراوانی رونوشت‌های دارای نشانگر EST-SSR در عدس بیشترین رکورد را بعد از پایگاه NR در بلاست علیه داده‌های پروتئینی یونجه یک‌ساله با ۸۰ درصد و نخود با ۷۹/۵ درصد دارد که با توجه به شباهت بالای ژنوم این دو گیاه از نظر ارتولوژی به عدس این نتایج مورد انتظار است (Gujaria-Verma *et al.*, 2014; Sudheesh *et al.*, 2016). ۷۶/۵ درصد از این رونوشت‌ها در بلاست علیه داده‌های پروتئینی آرابیدوپسیس رکورد دریافت کردند.

از 10547 رونوشت دارای نشانگر EST-SSR، تعداد ۳۸۵۱ (۳۶ درصد از توالی بلاست شده)

1. Biological Process
2. Cellular Component
3. Molecular Function



شکل ۳. نمودار دسته‌بندی کارکردی یونی‌ژن‌های حاوی نشانگر EST-SSR. بخش‌های مختلف شامل زیرگروه‌های فرآیندهای بیولوژیکی (biological process)، اجزای سلولی (Cellular Component) و عملکرد مولکولی (Molecular Function) است.

گیاهان زراعی اطلاعات ژنتیکی محدودی از آن در پایگاه‌های داده‌های ژنتیکی موجود است. با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید امکان توسعه بیشتر نشانگرهای EST-SSR فراهم می‌گردد. نشانگرهای EST-SSR شناسایی شده در این تحقیق می‌تواند منبع مهمی برای مطالعات پایه ژنتیکی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی باشد. مقایسه تعداد نشانگرهای حاصل از سرهم‌بندی EST‌های موجود در پایگاه داده NCBI و نشانگرهای حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه توالی‌یابی شده در مطالعه حاضر نشان‌دهنده کارآمدی بالای توالی‌یابی نسل جدید در پیدا کردن نشانگر EST-SSR است و شناسایی نشانگرهای بیشتر به تعیین نقشه ژنومی کمک می‌کند. شناسایی EST-SSR‌هایی که در رونوشت ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی قرار دارند به گروه‌بندی ارقام عدس براساس میزان تحمل و یا مقاومت به خشکی کمک می‌کند.

REFERENCES

- 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.
- Aydogdu A, Kirtil E, Sumnu G, Oztop MH, Aydogdu Y (2018) Utilization of lentil flour as a biopolymer source for the development of edible films. *J. Appl. Polym. Sci.* 135: 46356.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods.* 10(1): 57-59.
- Bosamia TC, Mishra GP, Thankappan R, Dobarja JR (2015) Novel and stress relevant EST derived SSR markers developed and validated in peanut. *PloS one.* 10: e0129127.
- Chen H, Wang L, Wang S, Liu C, Blair MW, Cheng X (2015a) Transcriptome sequencing of mung bean (*Vigna radiate* L.) genes and the identification of EST-SSR markers. *PloS one.* 10: e0120273.
- Chen H, Liu L, Wang L, Wang S, Somta P, Cheng X (2015b) Development and validation of EST-SSR markers from the transcriptome of adzuki bean (*Vigna angularis*) *PloS one.* 10: e0131939.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics.* 21: 3674-3676.
- 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 (11) e325.
- در مطالعه EST-SSR مرتبط با تنش در بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) بیشترین نشانگرها به ژن‌هایی مربوط بودند که در گروه‌های کارکردی اتصال، فرآیند سلولی و اجزای سلول قرار داشتند (Bosamia *et al.*, 2015a). مطالعه کارکرد احتمالی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در شبدر قرمز (*Trifolium pratense* L.) نشان داد که زیرگروه فرآیند متابولیکی به همراه زیرگروه انتقال یون بیشترین تعداد ژن را هم در رقم حساس و هم در رقم مقاوم دارد. همچنین با توجه به اینکه در زیرگروه فرآیند متابولیکی هم تعداد زیادی ژن پاسخ‌دهنده به تنش خشکی و هم تعداد زیادی EST-SSR شناسایی شده است، احتمال شناسایی نشانگرهای کارآمدی که همبستگی بالایی با ژن‌های مربوط به فرآیند متابولیکی دارند، وجود دارد (Yates *et al.*, 2014).
- گیاه عدس به دلیل داشتن ژنوم بزرگ و پیچیده کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است و نسبت به بقیه

- FAO: Food and Agricultural Organization. (2013). <http://www.fao.org>. Accessed 1 Feb 2016.
- Fungtammasan A, Ananda G, Hile SE, Su MS-W, Sun C, Harris R, Medvedev P, Eckert K, Makova KD (2015) Accurate typing of short tandem repeats from genome-wide sequencing data and its applications. *Genome Res.* 25: 736-749.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 591-611.
- Gujaria-Verma N, Vail SL, Carrasquilla-Garcia N, Penmetsa RV, Cook DR, Farmer AD, Vandenberg A, Bett KE (2014) Genetic mapping of legume orthologs reveals high conservation of synteny between lentil species and the sequenced genomes of Medicago and chickpea. *Front. Plant Sci.* 5: 676.
- Gupta PK, Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica.* 113: 163-185.
- 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.
- Hao X, Yang T, Liu R, Hu J, Yao Y, Burlyaeva M, Wang Y, Ren G, Zhang H, Wang D (2017) An RNA Sequencing Transcriptome Analysis of Grasspea (*Lathyrus sativus* L.) and Development of SSR and KASP Markers. *Front. Plant Sci.* 01873
- Harmon M, Lane T, Staton M, Coggeshall MV, Best T, Chen CC, Liang H, Zembower N, Drautz-Moses DI, Hwee YZ (2017) Development of novel genic microsatellite markers from transcriptome sequencing in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) *BMC Res. Notes.* 10: 369.
- Hoseini J, Nasiri M, Mahallati (2006) Effect of seed pretreatment on germination of lentil genotypes. *Iranian J. Agri. Res.* 4 (1): 35-47. (In Persian)
- Huang D, Zhang Y, Jin M, Li H, Song Z, Wang Y, Chen J (2014) Characterization and high cross-species transferability of microsatellite markers from the floral transcriptome of *Aspidistra saxicola* (Asparagaceae). *Mol. Ecol. Resour.* 14: 569-577.
- Anonymus (2012) Iran Agriculture Statistics. from: www.nationmaster.com/country-info/profiles/Iran/Agriculture.
- Jia X P, Deng Y M, Sun X B, Liang L J, Ye X Q (2015) Characterization of the global transcriptome using Illumina sequencing and novel microsatellite marker information in seashore paspalum. *Genes and Genome.* 37: 77-86.
- Jiang Y, Li H, Zhang J, Xiang J, Cheng R, Liu G (2018) Whole Genomic EST-SSR Development Based on High-Throughput Transcript Sequencing in Proso Millet (*Panicum miliaceum*). *Int. J. Agric. Biol.* 20: 617-620.
- Kumar S, Barpete S, Kumar J, Gupta P, Sarker A (2013) Global lentil production: constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra-Annu. Tech.* 17: 1-13.
- Li MY, Yang F, Feng X, Li L, Gu Y, Tian J, Wang J, Wang Z, Li A, Chen X, Chen, Zhang Z (2016) SSR development and utilization with *Rehmannia glutinosa* transcriptome. *Int. J. Agric. Biol.* 18: 589-600.
- Liu Z, Chen T, Ma L, Zhao Z, Zhao PX, Nan Z, Wang Y (2013) Global transcriptome sequencing using the Illumina platform and the development of EST-SSR markers in autotetraploid

- alfalfa. PloS one. 8: e83549.
- Lucas S, Harmon-Smith M, Lail K, (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. Nat. 463: 763-768.
- 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.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nat. Genet. 30 (2): 194-200.
- Meyer L, Causse R, Pernin F, Scalone R, Bailly G, Chauvel B, Délye C, Le Corre V (2017) New gSSR and EST-SSR markers reveal high genetic diversity in the invasive plant *Ambrosia artemisiifolia* L., can be transferred to other invasive *Ambrosia* species. PloS one. 12: e0176197.
- 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.
- Mun JH, Kim DJ, Choi HK, Gish J, Debellé F, Mudge J, Denny R, Endré G, Saurat O, Dubez AM (2006) Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. Genet. 172: 2541-2555.
- Muscolo A, Sidari M, Anastasi U, Santonoceto C, Maggio A (2014) Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. J. Plant Interact. 9: 354-363.
- Pan L, Xia Q, Quan Z, Liu H, Ke W, Ding Y, (2009) Development of novel EST-SSRs from sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) and their utilization for the genetic diversity analysis of *N. nucifera*. J. Hered. 101: 71-82.
- Panahyan-e-Kivi M, Ebadi A, Tobeh A, Jamaati-e-Somarin S (2009) Evaluation of yield and yield components of lentil genotypes under drought stress. Res. J. Environ. Sci. 3: 456-460.
- Parsa M, Bagheri A (2008) Legumes. Mashhad Univers. Jahad Press. (in Persian)
- Putman AI, Carbone I, (2014) Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. Ecol. Evol. 4: 4399-4428.
- Qiu LJ, Yang C, Tian B, Yang JB, Liu AZ (2010) Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.). BMC Plant Biol. 10: 278.
- Reda A. (2015) Lentil (*Lens culinaris* Medikus) Current status and future prospect of production in Ethiopia. Adv. Plants Agric. Res. 2(2): 1-9.
- Sabaghpour S H, Seyedi F, Mahmoodi AA, Safikhani M, Pezeshkpour P, Rostemi B (2013) Kimiya, A New High Yielding Lentil Cultivar for Moderate Cold and Semi Warm Climate of Iran. Seed and Plant Improvement J. 29 (9): 397-399. (in Persian).
- Sarker A, Erskine W (2006) Recent progress in the ancient lentil. J. Agric. Sci. 144: 19-29.
- Sathyanarayana N, Pittala RK, Tripathi PK, Chopra R, Singh HR, Belamkar V, Bhardwaj PK, Doyle JJ, Egan AN (2017) Transcriptomic resources for the medicinal legume *Mucuna pruriens*: de novo transcriptome assembly, annotation, identification and validation of EST-SSR markers. BMC Genomics. 18: 409.
- Shafiee M, Mardi M, Fattahi Moghaddam MR, Zamani Z (2014) Study of genetic relationship in some Citrus species using EST-SSRs developed by

- transcriptome sequencing of clementine. *Modern Genet. J.* 9:3 (38): 289-298. (in persian)
- 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.
- Siva N, Johnson CR, Duckett S, Jesch ED Thavarajah P (2017) Can lentil (*Lens culinaris* Medikus) reduce the risk of obesity? *J. Funct. Foods.* 38: 706-715.
- 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.
- 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.
- Wei W, Qi X, Wang L, Zhang Y, Hua W, Li D, Lv H, Zhang X. (2011) Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC Genomics.* 12: 451.
- Yates SA, Swain MT, Hegarty MJ, Chernukin I, Lowe M, Allison GG, Ruttink T, Abberton, MT, Jenkins G, Skot L (2014) De novo assembly of red clover transcriptome based on RNA-Seq data provides insight into drought response, gene discovery and marker identification. *BMC Genomics.* 15: 453.
- Zhang L, Yuan D, Yu S, Li Z, Cao Y, Miao Z, Qian H, Tang K (2004) Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics.* 20: 1081-1086.
- 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.
- Zhou Q, Luo D, Ma L, Xie W, Wang Y, Wang Y, Liu Z, (2016) Development and cross-species transferability of EST-SSR markers in Siberian wildrye (*Elymus sibiricus* L.) using Illumina sequencing. *Sci. Rep.* 6: 20549.