ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۱۷۰ - ۱۶۱

شناسایی نشانگرهای مولکولی ریزماهواره در مقیاس گسترده در مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری

Large Scale Identification of SSR Molecular Markers in *Satureja khuzistanica* Jamzad and *Satureja rechingeri* Jamzad

سمیه شمس[۱]، احمد اسماعیلی*[۲]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲]، حسن مومیوند[۳]

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

Shams S[1], Ismaili A[*2], Nazarian Firouz-Abadi F[2], Mumivand H[3]

1- PhD Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3- Assistant professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

مرزه از خانواده Lamiaceae، گیاهی دارویی است که به‌طور گسترده در مناطق جنوبی ایران می‌روید. گونه‌های مختلف این گیاه، دارای خواص دارویی زیادی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی و کاربردهای پزشکی می‌باشند. فقدان نشانگرها و به‌ویژه نشانگر ریزماهواره، تحقیقات ژنتیکی در این گیاه را بسیار محدود کرده است. لذا در این مطالعه، به‌ترتیب ۲۷۱۹۰۷ و ۲۲۵۵۳٤ رونوشت با میانگین طول ۱۰۷۹ و ۱۰۱۸ باز و مقدار N50 برابر ۱۸۰۲ و ۱۷٤۰ برای مرزه خوزستانی و رشینگری به‌دست آمد. از فرآیند سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه حاصل از توالی‌یابی ترانسکریپتوم گیاه مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری به‌منظور شناسایی نشانگرهای ریزماهواره استفاده شد. در مطالعه حاضر، ٤٤٦۲٤ و ۳٤٥٤٦ مکان ریزماهواره به‌ترتیب در گونه مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری شناسایی شد. در میان این نشانگرها، موتیف‌های دو نوکلئوتیدی و پس از آن تک و سه نوکلئوتیدی بالاترین فراوانی را نشان دادند. نتایج بلاست رونوشت‌های حاوی ریزماهواره نشان داد که در گونه‌های مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری به‌ترتیب ۷۲/۲۷ و ۷۵/۳۲ درصد از رونوشت‌ها دارای حداقل یک رکورد در پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری بودند. تفسیر کارکردی از طریق جستجوی همسانی و هستی‌شناسی ژن‌ها (GO) انجام شد. در مجموع، ۱٤۷۹۲ (۳۳/٤ درصد) رونوشت حاوی نشانگر SSR در مرزه خوزستانی و ۱۲٤۸۰ (۳٦/۱۲ درصد) رونوشت حاوی نشانگر SSR در مرزه رشینگری به سه گروه GO طبقه‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن گزارش داد که اکثر رونوشت‌های سرهم‌بندی شده به گروه عملکرد مولکولی (MF) مرتبط هستند. ٤٥ درصد از کل رونوشت‌های حاوی ریزماهواره به ٤۰۱ مسیر اختصاص داده شدند، که در آن‌ها بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پس از مسیرهای متابولیتی دومین مسیر با حدکثر تعداد عضو شناسایی شد. نشانگرهای ریزماهواره شناسایی شده از ترانسکریپتوم مرزه برای اولین بار در دنیا گزارش می‌شوند و می‌توانند منبع مؤثری برای برنامه‌های اصلاح این گیاه دارویی باشد.

واژه‌های کلیدی

مرزه خوزستانی
مرزه رشینگری
موتیف‌های دو نوکلئوتیدی
نشانگر ریزماهواره

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

وجود تنوع اقلیمی گسترده در ایران منجر به رویش بسیاری از گیاهان در این منطقه شده است. در فلور غنی ایران بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی وجود دارد که تعداد زیادی از این گیاهان جز گیاهان دارویی و معطر می‌باشند (Mozaffarian 1996). از جمله این گیاهان، تیره نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد. خانواده نعناعیان با نزدیک به ۷۰۰۰ گونه و بیش از ۲۳۰ جنس از متنوع‌ترین خانواده‌های گیاهی هستند (Zarshenas and Krenn 2015). این خانواده جز گیاهان دو لپه‌ای به‌شمار می‌رود و به‌علت وجود ساختارهای گرانولار تولیدکننده اسانس، جز گیاهان دارویی به حساب می‌آید (Usano-Alemany et al. 2014). در بین جنس‌های این خانواده، جنس *Saturja* شامل بیش از ۲۰۰ نوع از گیاهان و یا درختچه‌های گوناگون معطر است که به‌طور گسترده در مناطق آسیایی و مدیترانه‌ای یافت می‌شوند (Rustaiyan et al. 2004). گیاه مرزه دارای قائده‌های چوبی و بالشتکی می‌باشد. این گیاه عطردار، دارای ساقه‌های زیاد، افراشته، خیزان و یا کمانی است. مرزه خوزستانی (*Satureja Khuzistanica* Jamzad) و مرزه رشینگری (*Satureja rechingeri* Jamzad) از گونه‌های انحصاری جنس مرزه در ایران و متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشند (Jamzad 1994) که بیشتر در مناطق جنوبی ایران توزیع شده‌اند (Sefidkon et al. 2004). مهم‌ترین ترکیبات اسانس مرزه خوزستانی و رشینگری شامل کارواکرول (بالای ۹۰ درصد)، پاراسیمین، آلفا ترپینن، لیمونن، ۱-۸-سینئول، یوگنول و میرسن می‌باشد (Jamzad 2009). مرزه به‌علت مقدار کارواکرول بالا در اسانس و اسیدهای فنولی آزاد، به‌ویژه رزماریک اسید در عصاره برای اهداف تجاری بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Sefidkon et al. 2007). پیشرفت‌های جدید فن‌آوری، دامنه ارزیابی‌های چند شکلی DNA را برای نقشه‌برداری ژنتیکی، اثر انگشت ژنوم، انتخاب به‌کمک نشانگر و بررسی ارتباطات ژنتیکی گسترش داده است (Zalapa et al. 2012). این تکنیک‌های رایج شامل تجزیه و تحلیل چند شکلی‌ها در طول قطعات حاصل از برش آنزیمی DNA (AFLP)، نشانگرهای DNA چند شکلی حاصل از تکثیر تصادفی (RAPD)، چند شکلی‌های طول قطعه محدود (RFLP) و توالی‌های تکراری ساده یا ریزماهواره‌ها (SSR) می‌باشند. این روش‌ها با ارزیابی زیرمجموعه‌هایی از تغییر توالی DNA در ژنوم، چند شکلی را تشخیص می‌دهند (Chen et al. 2019). در میان این نشانگرها، ریزماهواره‌ها به‌دلیل تکرار پذیری بالا، طبیعت چندآللی، وراثت‌پذیری همبارز، فراوانی نسبی بالا و پوشش خوب در ژنوم، کاربردهای فراوانی در ژنتیک و اصلاح گیاهان گیاهان دارند (Singh et al. 2010). با بهبود فن‌آوری تعیین توالی نسل جدید (NGS)، توالی‌یابی RNA به تدریج به یک روش مناسب و کارآمد برای تشخیص نشانگر SSR تبدیل شده و به‌طور گسترده در گونه‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است (Singh et al. 2010). داده‌های ترانسکریپتوم منبع خوبی برای توسعه نشانگرهای SSR درون ژنی هستند (Torales et al. 2018). SSRها فراوان‌ترین منابع برای بررسی تنوع ژنتیکی، تبارزایی و پژوهش‌های اکولوژیکی هستند (Mizusawa et al. 2011). با توجه به اینکه SSRها به‌طور گسترده و فراوان در اکثر مناطق ژنوم هسته در یوکاریوت‌ها پراکنده شده‌اند؛ در سال‌های اخیر به‌عنوان نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Yuan et al. 2015). مطالعات بسیاری استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترانسکریپتوم را روشی کارآمد برای گسترش نشانگرهای SSR معرفی کرده‌اند (Feng et al. 2017). نشانگرهای مولکولی تقریباً در تمام گونه‌های گیاهان می‌توانند از توالی‌های ترنسکریپتوم یا ژنوم در مقیاس وسیع ایجاد شوند. یکی از مزایای شناسایی نشانگرها از توالی‌های ترنسکریپتوم، ارتباط آن‌ها با ژن‌های کارکردی است (Hiremath et al. 2011). این نشانگرها داده‌های ارزشمند ژنتیکی را برای اهداف اصلاحی میسر می‌کنند (Kadkhodaei et al. 2011). زیرا ریزماهواره‌های بر پایه ژن، قابلیت انطباق بالاتری برای سایر گونه‌ها دارند (Blanca et al. 2011). تاکنون مطالعات زیادی با استفاده از نشانگرهای مولکولی بر روی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی صورت گرفته است (Domyati et al. 2011). Mudalkar et al. (1979) نشانگر ریزماهواره را در گیاه کاملینا شناسایی کرده‌اند (Mudalkar et al. 2014). در مطالعات دیگر ۷۴۳۹ نشانگر ریزماهواره در گیاه مریم گلی (Ali et al. 2017) همچنین ۴۸۰۰ نشانگر ریزماهواره در گیاه هوتوینا کورداتا شناسایی شد (Wei et al. 2014). تاکنون هیچ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

گزارشی از شناسایی نشانگرهای مولکولی در جنس مرزه منتشر نشده است. هدف اصلی از این پژوهش، شناسایی نشانگرهای ریزماهواره در دو گونه دارویی مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری در مقیاس گسترده با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بود که امید می‌رود در تحقیقات آینده این گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های مرزه خوزستانی و رشینگری از شرکت تولید گیاهان دارویی و کشت و صنعت خرمان، شهر خرم‌آباد، استان لرستان، ایران تهیه شدند. تمامی مراحل کشت، نگه‌داری و پرورش گیاهان در شرایط تحت کنترل گلخانه با دمای ۲۵°C و شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت. گلدان‌ها با مخلوط خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی با نسبت ۱:۱:۳ پر شد. آبیاری بر اساس نیاز گیاه انجام شد. برگ‌ها در مرحله گلدهی جمع‌آوری شدند. همه نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگی با استفاده از بافر ترایزول (Trizol reagent) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Life technology) استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. خلوص نمونه‌های RNA استخراج شده، با بررسی نسبت‌های OD به‌دست آمده ارزیابی شد. کیفیت RNA استخراجی توسط الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد تعیین شد. سه کتابخانه cDNA برای هر گونه با استفاده از کیت TruSeq™ RNA Sample Preparation Illumina بر اساس پروتکل شرکت سازنده آماده‌سازی و با استفاده از پلتفرم۲۵۰۰ Illumina HiSeq به‌صورت طول خوانش ۱۵۰ جفت‌باز و به‌صورت دو طرفه توسط شرکت Novogene کشور چین توالی‌یابی شد.

کیفیت خوانش‌های خام با استفاده از نرم‌افزار FastQC (نسخه ۰.۱۱.۵) ارزیابی شدند (Andrews 2010). خوانش‌های کیفیت پایین و حذف آداپتور با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰.۳۶) پالایش شدند (Bolger et al. 2014). خوانش‌های با کیفیت بالا با استفاده از Trinity (نسخه ۲.۸.۵) با پارمترهای پیش فرض سر هم‌بندی نو پدید (De novo assembly) شدند (Haas et al. 2013; Grabherr et al. 2011). توالی‌های فاقد بیان یا با بیان کم (FPKM<1) با استفاده از ابزار Trinity پالایش شدند (De Sá et al. 2015). جهت اعتبارسنجی و ارزیابی کیفیت سرهم‌بندی نو پدید، خوانش‌ها بر روی رونوشت‌های سرهم‌بندی شده با استفاده از بسته bowtie ۲، با پارامترهای پیش فرض نقشه‌یابی شدند (Schliesky et al. 2012).

ابزار MISA (http: // pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/) (Beier et al. 2017) برای شناسایی SSRها استفاده شد. پارامترهای مورد استفاده برای انتخاب SSR بر اساس حداقل تعداد تکرارها به شرح زیر بود: ۱۲ تکرار برای تک نوکلئوتیدی، شش تکرار برای دو نوکلئوتیدی، پنج تکرار برای سه و چهار نوکلئوتیدی، چهار تکرار برای توالی‌های پنج و شش نوکلئوتیدی. اگر طول توالی بین دو SSR صد یا کم‌تر از صد نوکلوتید بود، ریزماهواره مرکب تعریف شد (Park et al. 2019).

به‌منظور مستندسازی و تفسیر کارکردی رونوشت‌های حاوی نشانگر از الگوریتم blastx استفاده و رونوشت‌های حاوی نشانگر در مقابل پایگاه داده‌های NCBI Non-redundant (Nr) و Swiss-Prot (Consortium 2014) با در نظر گرفتن حد آستانه e-value مساوی $1e^{-5}$ مورد هم‌ردیفی قرار گرفت (Park et al. 2019 Feng et al., 2017;). سپس نتایج به نرم‌افزار Trinotate منتقل شدند تا هستی‌شناسی (GO) رونوشت‌های حاوی نشانگر انجام شود (https://trinotate.github.io/). برای این منظور، نرم‌افزار رونوشت‌های حاوی نشانگر را با GO termها هم‌ردیف کرده، کارکرد آن‌ها را مشخص می‌کند. نتایج با استفاده از وبسایت WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plot) ترسیم شد (Ye et al. 2006). blastp در مقابل پایگاه داده دانشنامه کیوتو ژن‌ها و ژنوم (KEGG) با استفاده از سرور هستی‌شناسی اتوماتیک KEGG (نسخه ۱.۲) (KASS) (https://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main?mode=partial) (Moriya et al. 2007) جهت تعیین مسیرها، تخصیص KO و توضیح عملکرد رونوشت‌های سرهم‌بندی شده (پیش فرض: ۶۰ , Bit-score threshold) انجام شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

نتایج و بحث

توالی‌یابی و کنترل کیفیت

پس از پالایش و حذف قرائت‌های با کیفیت پایین (Q score Phred quality score کمتر از ۲۰)، بیش از ۹۵ درصد از خوانش‌های دو طرفه در سه کتابخانه بیولوژیکی حفظ و حدود ۵ درصد از خوانش‌های کوتاه حذف شدند. از خوانش‌های تمیز (پالایش شده) جهت انجام سر هم‌بندی استفاده شد. پس از سر هم‌بندی، به‌ترتیب، ۹۸/٤۸ و ۹۸/٤۱ درصد از خوانش‌ها به‌طور صحیح با رونوشت‌های سرهم‌بندی شده مرزه خوزستانی و رشینگری هم‌ردیف شدند که این مقدار نشان‌دهنده کیفیت خوب سر هم‌بندی انجام شده است (Mousavi et al. 2014).

نتایج سرهم‌بندی خوانش‌ها

نتایج حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌ها نشان داد که به‌ترتیب ۲۷۱۹۰۷ و ۲۲۵۵۳٤ رونوشت در مرزه خوزستانی و رشینگری به‌دست آمد. میانگین طول رونوشت‌ها در مرزه خوزستانی و رشینگری به‌ترتیب ۱۰۷۹ و ۱۰۱۸ جفت‌باز بود. میزان N50 در کانتیگ‌های ایجاد شده برای مرزه خوزستانی و رشینگری با کاربرد k-mer مساوی ۲۵، به‌ترتیب N50=۱۸۰۲ bp و N50=۱۷٤۰ bp بود. N50 این ترانسکریپتوم مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری بالاتر از N50 در مطالعات قبلی در دیگر گیاهان این خانواده مانند مریم گلی (۱۳٤۰ bp) (Zhou et al. 2017) و دراکوسپالوم تنگوتیکوم (۱۱۱۸ bp) (Li et al. 2017) بود.

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره

در این بررسی مکان‌های ریزماهواره در گیاه مرزه خوزستانی و رشینگری با استفاده از توالی‌های ترنسکریپتوم ردیابی شدند. نتیجه استخراج بیوانفورماتیکی SSRها در جدول ۱ خلاصه شده است. در مطالعه حاضر، از میان ۱۷۷۱۵٤ و ۱۵۳۳٤۱ رونوشت مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری، به‌ترتیب ٤٤٦۲٤ (۲۵/۱۹ درصد) و ۳٤۵٤٦ رونوشت (۲۳/۱۸ درصد) توالی حاوی SSR با اندازه ۱ تا ٦ نوکلئوتید بودند. این میزان با پژوهش‌های گذشته به‌منظور شناسایی توالی حاوی SSR از روی ترانسکریپتوم برگ علف لیمو (چمن معطر) (۱۷۱۰۵ رونوشت حاوی SSR) قابل مقایسه است (Meena et al. 2016). هر چند تفاوت بین گونه‌ها، اندازه رونوشت‌های مونتاژ شده، معیارهای جستجوی SSR و ابزارهای استخراج پایگاه داده می‌تواند منجر به اختلاف در فراوانی SSRها در بین گونه‌های مختلف شود (Wei et al. 2014).

برای گیاهان دارویی، استفاده از نشانگرهای SSR به‌دلیل کم بودن اطلاعات ژنتیکی و کمبود داده‌های بیان ژن، هنوز در مراحل ابتدایی است. اخیراً، با افزایش استفاده از تحقیقات ژنومی عملکردی در گیاهان دارویی، نشانگرهای SSR بر اساس توالی ترانسکریپتوم برای گیاهان دارویی *Panax ginseng* (Wu et al. 2011)، *Salvia miltiorrhiza* (Deng et al. 2009)، *Epimedium sagittatum* (Zeng et al. 2010) و *Lonicera japonica* (Jiang et al. 2012) شناسایی شده‌اند. این داده‌ها برای تجزیه و تحلیل‌هایی مانند ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی ژرم پلاسم در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گرفته است.

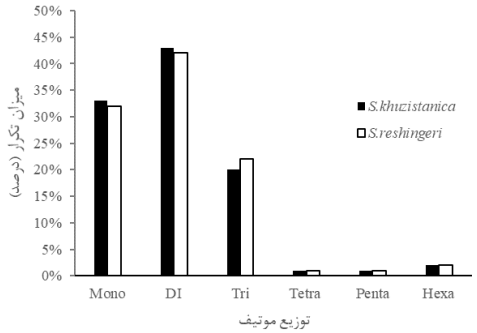
از کل SSRهای شناسایی شده، ۳۱۷۵۰ (۷۱/۱۵ درصد) رونوشت برای مرزه خوزستانی و ۲٤۳۰۹ (۷۰/۳٦ درصد) رونوشت برای مرزه رشینگری دارای تنها یک ریزماهواره و ۱۲۸۷٤ (۲۸/۸۵ درصد) برای مرزه خوزستانی و ۱۰۲۳۷ (۲۹/٦۳ درصد) رونوشت برای مرزه رشینگری دارای دو یا تعداد بیشتری ریزماهواره بودند.

جدول ۱- استخراج بیوانفورماتیکی نشانگر SSR در دو گونه مرزه مورد مطالعه

	مرزه خوزستانی	مرزه رشینگری
تعداد کل توالی‌های بررسی شده	۱۷۷۱۵٤	۱۵۳۳٤۱
اندازه توالی‌های بررسی شده (bp)	۲۲۹٦۰۲٤۸٦	۱٦۱۵۲۹۸۲٦
تعداد کل SSRهای شناسایی شده	٦۲۵۲۸	٤۸۸۸۰
تعداد توالی‌های حاوی SSR	٤٤٦۲٤	۳٤۵٤٦
تعداد توالی‌های حاوی بیش از یک SSR	۱۲۸۷٤	۱۰۲۳۷

تعداد SSRهای مرزه خوزستانی در همه‌ی انواع تکرارها از SSRهای مرزه رشینگری بیشتر بودند اما درصد SSR تقریباً یکسان بود (شکل ۱). در دو گونه، ریزماهواره‌های دو نوکلئوتیدی (٤۲ درصد) و پس از آن به‌ترتیب تک (۳۲ درصد) و سه‌تایی (۲۲ درصد) فراوان‌ترین موتیف بودند. انواع نوکلئوتیدهای چهار، پنج (۱ درصد) و شش‌تایی (۲ درصد) کمترین فراوانی را نشان دادند (شکل ۱).

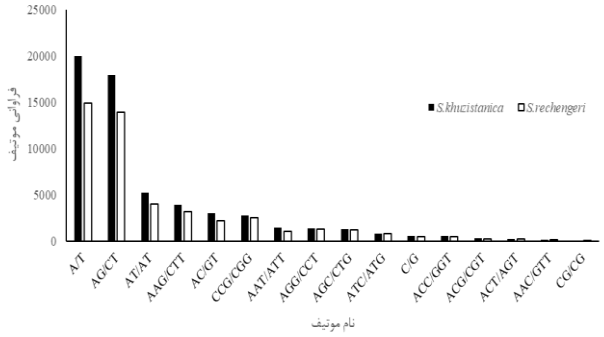
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۱- مقایسه توزیع نشانگر SSR براساس طول موتیف در دو گونه مرزه مورد مطالعه

این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده از بررسی ترانسکریپتوم گیاه *Ocimum basilicum* و *Ocimum sanctum* (اعضای یک خانواده) بوده که تکرارهای دو نوکلئوتیدی و سپس سه نوکلئوتیدی به‌عنوان فراوان‌ترین نوع موتیف گزارش شده است (Rastogi et al. 2014). نتایج مشابهی در برخی گیاهان دولپه‌ای دیگر مانند گیاه مدل آربیدوپسیس گزارش شده است (Kumpatla and Mukhopadhyay 2005).

در تحقیق حاضر، در بین موتیف‌های تکرار دو نوکلئوتیدی، AG/CT (مرزه خوزستانی: ۶۸/۳۵ درصد و مرزه رشینگری: ۶۹/۰۱ درصد) دارای بالاترین فراوانی بود (شکل ۲ و جدول۲).



شکل ۲- فراوانی موتیف/تکرارهای ریزماهواره شناسایی شده در ترنسکریپتوم مرزه

که با نتایج قبلی به‌دست آمده از بررسی ترانسکریپتوم گیاه *Zanthoxylum bungeanum* (Feng et al. 2017)، *Alismatifolia* *Curcuma* (Taheri et al. 2019) و مریم گلی (Asp et al. 2007) مشابه می‌باشد. همچنین در نتایج حاصل از بررسی ترانسکریپتوم گیاه *Salvia officinalis*، تکرارهای دو نوکلئوتیدی AG/CT بیشترین موتیف‌های شایع در همه SSRها تشخیص داده شد (Ali et al. 2017). پس از AG/CT موتیف‌های AT/AT (مرزه خوزستانی: ۱۹/۸۳ درصد و مرزه رشینگری: ۱۹/۸۸ درصد) و AC/GT (مرزه خوزستانی: ۱۱/۶۳ درصد و مرزه رشینگری: ۱۰/۹۰ درصد) بیش‌ترین فراوانی را در بین موتیف‌ها به‌خود اختصاص دادند (شکل ۲ و جدول ۲).

جدول۲- فراوانی موتیف در بین نشانگرهای شناسایی شده در مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری

موتیف	مرزه خوزستانی	مرزه رشینگری
A/T	۱۹۹۴۶	۱۴۸۸۸
C/G	۶۰۲	۴۶۱
AC/GT	۳۰۵۲	۲۱۹۷
AG/CT	۱۷۹۴۱	۱۳۹۱۳
AT/AT	۵۲۰۶	۴۰۰۷
AAC/GTT	۲۰۰	۱۷۹
AAG/CTT	۳۸۹۷	۳۱۷۸
AAT/ATT	۱۴۴۷	۱۰۹۵
ACC/GGT	۵۶۵	۵۲۱
ACG/CGT	۲۹۳	۲۷۹
ACT/AGT	۲۹۳	۲۰۸
AGC/CTG	۱۳۴۵	۱۱۹۰
AGG/CCT	۱۴۱۷	۱۲۷۸
ATC/ATG	۸۵۰	۷۹۶
CCG/CGG	۲۷۷۰	۲۵۲۸
AAAAG/CTTTT	۲۴۰	۱۸۸

در میان موتیف‌های تکراری تک نوکلئوتیدی، تکرارهای A/T (مرزه خوزستانی:۹۶/۹۰ درصد و مرزه رشینگری: ۹۷ درصد) فراوان‌تر از تکرارهای C/G بودند (Feng et al. 2017). فراوان‌ترین تکرار سه نوکلئوتیدی، AAG/CTT (مرزه خوزستانی: ۲۹/۹۲ درصد و مرزه رشینگری: ۲۸/۲۴ درصد) بود و مشابه گزارش‌های موجود در *Stylosanthes guianensis* (Ding et al. 2015) و *Cannabis sativa* (Gao et al. 2014) می‌باشد. در مطالعه دیگر بر روی *Salvia officinalis* از ۴۸۶۷۱ رونوشت، ۷۴۳۹ رونوشت دارای SSR بود. که به‌ترتیب تکرار دو نوکلئوتیدی (۴۴/۱۳۲ درصد)، سپس تک نوکلئوتیدی (۲۴/۱۳ درصد) و سه نوکلئوتیدی (۲۳/۸۱ درصد) بیشترین تعداد تکرار را به‌خود اختصاص دادند. موتیف‌های تکراری پنج نوکلئوتیدی

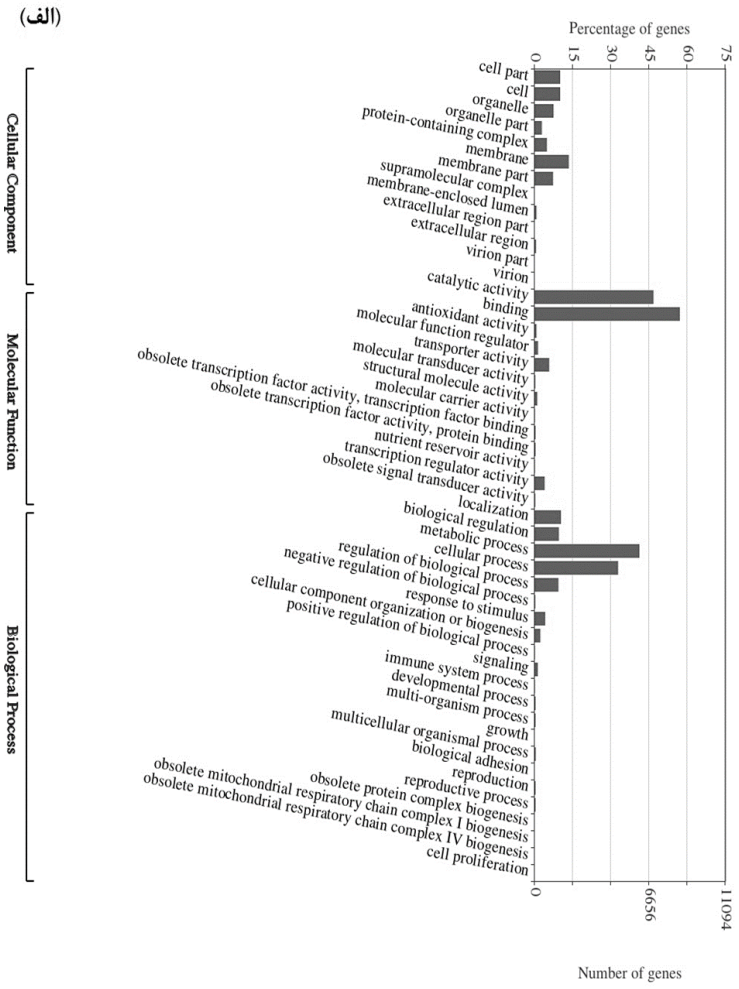
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

دارای حداقل فراوانی (۰/۳۵ درصد) بودند (Ali et al. 2017). فراوانی تکرارهای سه نوکلئوتیدی AAG/CTT به‌عنوان ویژگی خاص دو لپه‌ای‌ها مشاهده شده است (Kumpatla 2004)، که این نتایج مطالعه حاضر را پشتیبانی می‌کند. موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی دارای کم‌ترین فراوانی در بین کل موتیف‌ها بودند. با افزایش میزان تعداد نوکلئوتیدها در موتیف‌ها احتمال حضور و تکرار شدن آن‌ها در ژنوم کاهش می‌یابد (Ali et al. 2017).

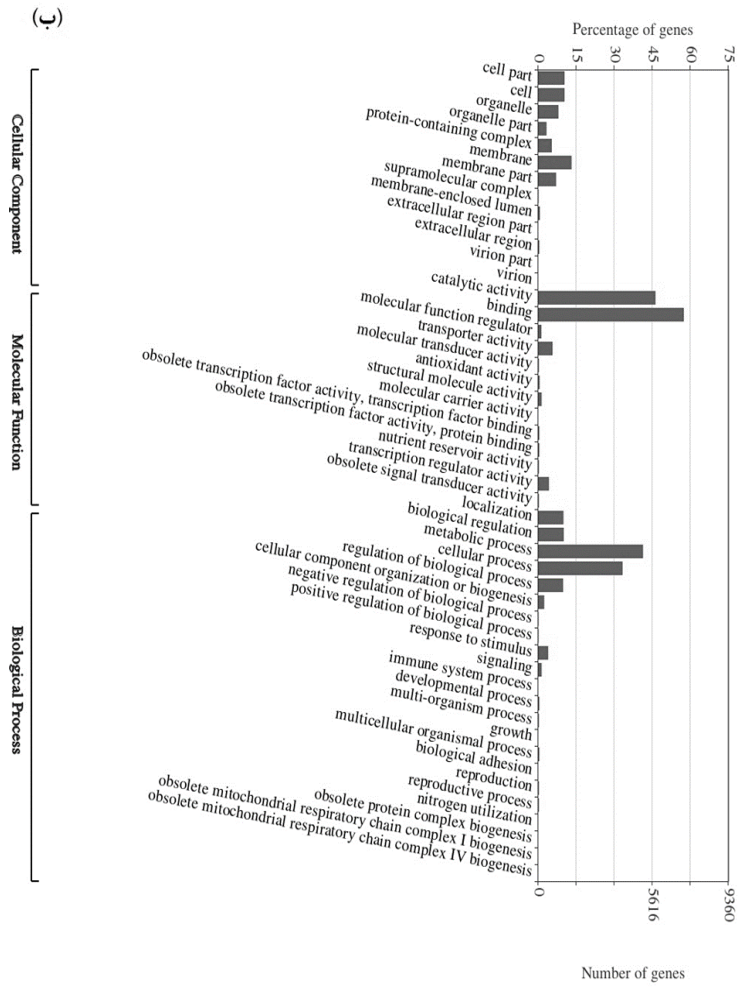
تفسیر کارکردی رونوشت‌های حاوی ریزماهواره

نتایج بلاست رونوشت‌های دارای نشانگر SSR در برابر پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری Nr (Non-redundant) نشان داد که ۳۲۲۵٤ (۷۲/۲۷ درصد) و ۲٦۰۳٤ (۷۵/۳۲ درصد) رونوشت دارای حداقل یک برخورد (hit) معنی‌دار در پایگاه داده NCBI (Nr) بوده است. همچنین نتایج BLASTx رونوشت‌های دارای نشانگر SSR در برابر پایگاه داده Swiss prot نشان داد که ۲۵۵۵۱ (۵۷/۲۵ درصد) و ۲۰۸۱۳ (٦۰/۲٤ درصد) توالی دارای رکورد مشابه بودند.

در مجموع، ۱٤۷۹۲ (۳۳/٤ درصد) و ۱۲٤۸۰ (۳٦/۱۲ درصد) ژن دارای نشانگر SSR به سه گروه هستی‌شناسی ژن (GO) (فرآیند زیستی (BP)، ترکیبات سلولی (CC) و عملکرد مولکولی (MF)) طبقه‌بندی شدند (شکل ۳).



[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل۳- نمودار دسته‌بندی کارکردی رونوشت‌های حاوی ریزماهواره الف) مرزه خوزستانی ب) مرزه رشینگری

در حوزه فرآیند زیستی، بیشترین تعداد GO مربوط به گروه کارکردی فرآیند متابولیکی (Metabolic process) (GO:0008152؛ مرزه خوزستانی: ٤١/٢ درصد و مرزه رشینگری: ٤١/٣ درصد) بود. در گیاه مرزه خوزستانی، بیشترین موتیف ۱ تا ٦ نوکلئوتیدی تکرار شده در ژن‌های گروه فرآیند متابولیکی شامل 12 (A)، 20(CT)، 5(AAT) و 4(AAAAG) و در گیاه مرزه رشینگری موتیف‌های13(A)، 6(CT)، 5(CGC)، 5(GAAA)، 4(AAAAG) بودند. در این گروه حضور GOهای مرتبط با توالی‌های حاوی تکرارهای ریزماهواره می‌تواند در شناسایی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با متابولیت‌های ثانویه کمک نماید (Tian et al. 2013). در حوزه اجزای سلولی، بیشترین تعداد GO مربوط به گروه کارکردی غشایی (Membrane) (GO:0016020، مرزه خوزستانی: ١٣/٤ درصد، مرزه رشینگری: ١٣/١ درصد) و پس از آن گروه کارکردی سلول (GO:0005623، مرزه خوزستانی: ۱۰ درصد، مرزه رشینگری: ۱۰/۳درصد) بود. در گیاه مرزه خوزستانی بیشترین موتیف تکرار شده ۱ تا ٦ نوکلئوتیدی در ژن‌های گروه کارکردی غشایی شامل 13(A)، 6(AG)، 5(CGC)، 5(TTAA)، 4(AAAAG) و 5(TTCTTG) و در گیاه مرزه شینگری شامل 12(A)، 6(AG)، 5(CCG)، 5(TTCT)، 4(CATAA) و4(AGGAGA) بوده است. حوزه عملکرد مولکولی اکثریت GOهای اشباع شده را به‌خود اختصاص داده است. در این حوزه زیر گروه کارکردی اتصال (Binding) (GO:0005488؛ مرزه خوزستانی: ٥٧/١ درصد و مرزه رشینگری: ٥٧/٤ درصد) و پس از آن فعالیت‌های کاتالیتیکی (Catalytic activity) (GO:0003824؛ مرزه خوزستانی: ٤٦/٧ درصد و مرزه رشینگری: ٤٦/٢ درصد) بیش‌ترین فراوانی را به‌خود اختصاص

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

داده است. در پژوهش Yang و همکاران بر روی گیاه مریم گلی (عضوی از همین خانواده) نیز نتایج مشابهی حاصل شد (Yang et al. 2013)، به‌طوری که گروه کارکردی اتصال بیشتر فراوانی را در حوزه عملکرد مولکولی به‌خود اختصاص داد. در گیاه مرزه خوزستانی بیشترین موتیف تکرار شده ۱ تا ٦ نوکلئوتیدی در ژن‌های گروه کارکردی اتصال، موتیف‌های (A)12، (CT)6، (GAA)5، (TTAA)5، (TGAGG)4 و (GAGAAA)4 و در گیاه مرزه رشینگری موتیف‌های (A)12، (TC)6، (CGG)5، (AAAG)5، (CCTCA)4 و(CCCCGG)4 بودند.

مستندسازی رونوشت‌های دارای نشانگر SSR در مقابل پایگاه داده KEGG حاکی از شناسایی ٤٠١ مسیر مختلف KEGG در مرزه خوزستانی و رشینگری می‌باشد که شامل گروه‌های متابولیسم، پردازش اطلاعات ژنتیکی، فرآیندهای سلولی، پردازش اطلاعات محیطی و سایر موارد می‌باشند. بیشتر رونوشت‌ها به مسیرهای متابولیکی و پس از آن مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه اختصاص داده شدند. مسیرهای KEGG pathway Global and overview شناسایی شده در مرزه خوزستانی و رشینگری، در جدول ۳ نشان داده شده است. به‌طور کلی در این مطالعه، نشانگرهای اختصاصی SSR بر اساس داده های توالی‌یابی ترانسکریپتوم شناسایی شد و توزیع آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این در حالی است که تاکنون گزارشی از نشانگرهای SSR برای مرزه ثبت نشده است. نتایج حاصل نشان داد که استفاده از ترانسکریپتوم یک روش مؤثر برای شناسایی نشانگرهای مولکولی در این جنس است. این مطالعه می‌تواند پایه‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی، نقشه‌برداری ژنتیکی و انتخاب به‌کمک مارکر در مرزه خوزستانی و رشینگری باشد. این مطالعه می‌تواند برنامه‌های اصلاح مولکولی در مرزه خوزستانی و رشینگری و همچنین سایر گونه‌های جنس *Satureja* با ارزش اقتصادی و دارویی را تسهیل کند.

جدول ۳- تعداد مسیرهای Global and overview KEGG pathway شناسایی شده در رونوشت‌های حاوی SSR مرزه خوزستانی و رشینگری

مسیرهای KEGG	عدد Ko	تعداد ژن شناسایی شده در مرزه خوزستانی	تعداد ژن شناسایی شده در مرزه رشینگری
مسیرهای متابولیکی	۰۱۱۰۰	٦۱۰	٦۱۳
بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه	۰۱۱۱۰	۳۲۸	۳۲۹
متابولیسم میکروبی در محیط‌های مختلف	۰۱۱۲۰	۱۱۳	۱۱۳
متابولیسم کربن	۰۱۲۰۰	۷۳	۷٤
متابولیسم ۲-اکسی کربوکسیلیک اسید	۰۱۲۱۰	۱۸	۱۹
متابولیسم اسیدهای چرب	۰۱۲۱۲	۱۹	۱۹
بیوسنتز اسیدهای امینه	۰۱۲۳۰	٦۵	٦۹
بیوسنتز کوفاکتورها	۰۱۲٤۰	۸۱	۸۱
تجزیه ترکیبات اروماتیک	۰۱۲۲۰	۳	۳
بیوسنتز sugar nucleotide	۰۱۲۵۰	۲۳	۲۳

منابع

Ali M, Li P, She G, Chen D, Wan X, Zhao J (2017) Transcriptome and metabolite analyses reveal the complex metabolic genes involved in volatile terpenoid biosynthesis in garden sage (*Salvia officinalis*). Scientific Reports 7:1-21.

Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.

Asp T, Frei UK, Didion T, Nielsen KK, Lübberstedt T (2007) Frequency, type, and distribution of EST-SSRs from three genotypes of *Lolium perenne*, and their

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

conservation across orthologous sequences of *Festuca arundinacea*, *Brachypodium distachyon*, and *Oryza sativa*. BMC Plant Biology 7:1-12.
Beier S, Thiel T, Münch T, Scholz U, Mascher M (2017) MISA-web: a web server for microsatellite prediction. Bioinformatics 33:2583-2585.
Blanca J, Cañizares J, Roig C, Ziarsolo P, Nuez F, Picó B (2011) Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). BMC Genomics 12:1-5.
Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114-2120.
Chen G, Yue Y, Hua Y, Hu D, Shi T, Chang Z, Yang X, Wang L (2019) SSR marker development in *Clerodendrum trichotomum* using transcriptome sequencing. PloS one 14:e0225451.
Consortium U (2014) Activities at the universal protein resource (UniProt). Nucleic Acids Research 42:7486-7486.
De Sá PH, Veras AA, Carneiro AR, Pinheiro KC, Pinto AC, Soares SC, Schneider MP, Azevedo V, Silva A, Ramos RT (2015) The impact of quality filter for RNA-Seq. Gene 563:165-171.
Deng KJ, Zhang Y, Xiong BQ, Peng JH, Zhang T, Zhao XN, Ren ZL (2009) Identification, characterization and utilization of simple sequence repeat markers derived from *Salvia miltiorrhiza* expressed sequence tags. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica 44:1165-1172.
Ding X, Jia Q, Luo X, Zhang L, Cong H, Liu G, Bai C (2015) Development and characterization of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers in tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Molecular Breeding 35:1-4.
Domyati FM, Younis RA, Edris S, Mansour A, Sabir G, Bahieldin A (2011) Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. Journal of Medicinal Plants Research 5:200-210.
Feng S, Zhao L, Liu Z, Liu Y, Yang T, Wei A (2017) De novo transcriptome assembly of *Zanthoxylum bungeanum* using Illumina sequencing for evolutionary analysis and simple sequence repeat marker development. Scientific Reports 7:1-11.
Gao C, Xin P, Cheng C, Tang Q, Chen P, Wang C, Zang G, Zhao L (2014) Diversity analysis in Cannabis sativa based on large-scale development of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. PloS One 9:e110638.
Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature Biotechnology 29:644-652.
Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature Protocols 8:1494-1512.
Hiremath PJ, Farmer A, Cannon SB, Woodward J, Kudapa H, Tuteja R, Kumar A, BhanuPrakash A, Mulaosmanovic B, Gujaria N, Krishnamurthy L (2011) Large-scale transcriptome analysis in chickpea (*Cicer arietinum* L.), an orphan legume crop of the semi-arid tropics of Asia and Africa. Plant Biotechnology Journal 9:922-931.
Jamzad Z (1994) A new species of the genus Satureja (Labiatae) from Iran. The Iranian Journal of Botany 6:215-218.
Jamzad Z (2009) Thymus and Satureja species of Iran. Publications of Research Institute of Forests and Rangelands: 171pp.
Jiang C, Yuan Y, Liu GM, Huang LQ, Wang XM, Yu J, Chen M (2012) EST-SSR identification of Lonicera japonica Thunb. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica 47:803-810.
Kadkhodaei S, Nekouei M, Shahnazari M, Etminani H, Imani A, Ghaderi-Zefrehei M, Elahy M, Ariff B (2011) Molecular tagging of agronomic traits using simple sequence repeats: Informative markers for almond (*'Prunus dulcis'*) molecular breeding. Australian Journal of Crop Science 5:1199-1209.
Kumpatla SP (2004) Computational mining and survey of simple sequence repeats (SSRs) in expressed sequence tags (ESTs) of dicotyledonous plants. PhD diss.
Kumpatla SP, Mukhopadhyay S (2005) Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. Genome 48:985-998.
Li H, Fu Y, Sun H, Zhang Y, Lan X (2017) Transcriptomic analyses reveal biosynthetic genes related to rosmarinic acid in *Dracocephalum tanguticum*. Scientific Reports 7:1-10.
Meena S, Kumar SR, Venkata Rao DK, Dwivedi V, Shilpashree HB, Rastogi S, Shasany AK, Nagegowda DA (2016) De novo sequencing and analysis of lemongrass transcriptome provide first insights into the essential oil biosynthesis of aromatic grasses. Frontiers in Plant Science7:1129.
Mizusawa L, Kaneko S, Hasegawa M, Isagi Y (2011) Development of Nuclear SSRs for the insular shrub *Clerodendrum izuinsulare* (Verbenaceae) and the widespread *C. trichotomum*. American Journal of Botany 98: e333-e336.
Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Research. 35(suppl_2):W182-5.
Mousavi S, Alisoltani A, Shiran B, Fallahi H, Ebrahimie E, Imani A, Houshmand S (2014) De novo transcriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in *Prunus dulcis* Mill. in response to freezing stress. PloS One 9:e104541.
Mozaffarian V (1996) A dictionary of Iranian plant names. Tehran, Iran. Farhang Moaser 396. (In Farsi).
Mudalkar S, Golla R, Ghatty S, Reddy AR (2014) De novo transcriptome analysis of an imminent biofuel crop, *Camelina sativa* L. using Illumina GAIIX sequencing platform and identification of SSR markers. Plant Molecular Miology 84:159-171.
Park S, Son S, Shin M, Fujii N, Hoshino T, Park S (2019). Transcriptome-wide mining, characterization, and

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

development of microsatellite markers in Lychnis kiusiana (Caryophyllaceae). BMC Plant Biology 19:1-2.
Rastogi S, Meena S, Bhattacharya A, Ghosh S, Shukla RK, Sangwan NS, Lal RK, Gupta MM, Lavania UC, Gupta V, Nagegowda DA (2014) De novo sequencing and comparative analysis of holy and sweet basil transcriptomes. BMC Genomics 15:1-18.
Rustaiyan A, Feizbakhsh A, Masoudi S, Ameri N (2004). Comparison of the volatile oils of *Satureja atropatan*a *Bung*. and *Satureja mutica* Fisch. et CA Mey. from Iran. Journal of Essential Oil Research 16:594-596.
Schliesky S, Gowik U, Weber AP, Bräutigam A (2012) RNA-seq assembly–are we there yet? Frontiers in Plant Science 3:220.
Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z, Ahmadi S (2007) The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. Food Chemistry 100:1054-1058.
Sefidkon F, Jamzad Z, Mirza M (2004) Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahendica* from Iran. Food Chemistry 88:325-328.
Singh RK, Bhatia VS, Bhat KV, Mohapatra T, Singh NK, Bansal KC, Koundal KR (2010) SSR and AFLP based genetic diversity of soybean germplasm differing in photoperiod sensitivity. Genetics and Molecular Biology 33:319-324.
Taheri S, Abdullah TL, Rafii MY, Harikrishna JA, Werbrouck SP, Teo CH, Sahebi M, Azizi P (2019) De novo assembly of transcriptomes, mining, and development of novel EST-SSR markers in *Curcuma alismatifolia* (Zingiberaceae family) through Illumina sequencing. Scientific Reports 9:1-14.
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 14:827.
Torales SL, Rivarola M, Gonzalez S, Inza MV, Pomponio MF, Fernández P, Acuña CV, Zelener N, Fornés L, Hopp HE, Paniego NB (2018) De novo transcriptome sequencing and SSR markers development for *Cedrela balansae* C. DC., a native tree species of northwest Argentina. PLoS One 13:e0203768.
Usano-Alemany J, Palá-Paúl J, Herráiz-Peñalver D (2014) Temperature stress causes different profiles of volatile compounds in two chemotypes of *Salvia lavandulifolia* Vahl. Biochemical Systematics and Ecology 54: 166-171.
Wei L, Li S, Liu S, He A, Wang D, Wang J, Tang Y, Wu X (2014) Transcriptome analysis of Houttuynia cordata Thunb. by Illumina paired-end RNA sequencing and SSR marker discovery. PloS one 9: e84105.
Wu T, Liang C, Li H, Piao Z (2011) Development of unigene derived microsatellite (UGMS) markers in *Panax ginseng*. Scientia Agricultura Sinica 44:2650-2660.
Yang L, Ding G, Lin H, Cheng H, Kong Y, Wei Y, Fang X, Liu R, Wang L, Chen X, Yang C (2013) Transcriptome analysis of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* and identification of genes related to tanshinone biosynthesis. PLoS One 8:e80464.
Ye J, Fang L, Zheng H, Zhang Y, Chen J, Zhang Z, Wang J, Li S, Li R, Bolund L, Wang J (2006) WEGO: a web tool for plotting GO annotations. Nucleic Acids Research 34: W293-W297.
Yuan Y, Long P, Jiang C, Li M, Huang L (2015) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on a full-length cDNA library of *Scutellaria baicalensis*. Genomics: 105:61-67.
Zalapa JE, Cuevas H, Zhu H, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. American Journal of Botany 99:193-208.
Zarshenas MM, Krenn L (2015) Phytochemical and pharmacological aspects of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & Esfand. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine 20:65-72.
Zeng S, Xiao G, Guo J, Fei Z, Xu Y, Roe BA, Wang Y (2010) Development of a EST dataset and characterization of EST-SSRs in a traditional Chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum* (Sieb. Et Zucc.) Maxim. BMC Genomics 11:1-11.
Zhou W, Huang Q, Wu X, Zhou Z, Ding M, Shi M, Huang F, Li S, Wang Y, Kai G (2017) Comprehensive transcriptome profiling of *Salvia miltiorrhiza* for discovery of genes associated with the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids. Scientific Reports 7:1-12.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]