

شناسایی نشانگرهای مولکولی ریزماهوره 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^۳، 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 S¹, Ismaili A^{*2}, Nazarian Firouz-Abadi F², Mumivand H³

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 ریزماهوره، تحقیقات ژنتیکی در این گیاه را بسیار محدود کرده است. لذا در این مطالعه، به‌ترتیب ۲۷۱۹۰۷ و ۲۲۵۵۳۴ رونوشت با میانگین طول ۱۰۷۹ و ۱۰۱۸ باز و مقدار N50 برابر ۱۸۰۲ و ۱۷۴۰ برای مرزه خوزستانی و رشینگری به‌دست آمد. از فرآیند سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه حاصل از توالی‌یابی ترانسکرپتوم گیاه مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری به‌منظور شناسایی نشانگرهای ریزماهوره استفاده شد. در مطالعه حاضر، ۴۴۶۲۴ و ۳۴۵۴۶ مکان ریزماهوره 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 ریزماهوره 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، ۱۴۷۹۲ (۳۳/۴ درصد) رونوشت حاوی نشانگر SSR در مرزه خوزستانی و ۱۲۴۸۰ (۳۶/۱۲ 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. ۴۵ درصد از کل رونوشت‌های حاوی ریزماهوره به ۴۰۱ مسیر اختصاص داده شدند، که در آن‌ها بیوستر متابولیت‌های ثانویه پس از مسیرهای متابولیتی دومین مسیر با حدکثر تعداد عضو شناسایی شد. نشانگرهای ریزماهوره شناسایی شده از ترانسکرپتوم مرزه برای اولین بار در دنیا گزارش می‌شوند و می‌توانند منبع مؤثری برای برنامه‌های اصلاح این گیاه دارویی باشند.

واژه‌های کلیدی

مرزه خوزستانی

مرزه رشینگری

موتیف‌های دو نوکلئوتیدی

نشانگر ریزماهوره

(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، ریزماهوره‌ها به دلیل تکرار پذیری بالا، طبیعت چندآلی، وراثت‌پذیری همباز، فراوانی نسبی بالا و پوشش خوب در ژنوم، کاربردهای فراوانی در ژنتیک و اصلاح 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 ترانسکریپتوم یا ژنوم در مقیاس وسیع ایجاد شوند. یکی از مزایای شناسایی نشانگرها از توالی‌های ترانسکریپتوم، 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 ریزماهوره‌های 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 ریزماهوره را در گیاه کاملینا شناسایی کرده‌اند (Mudalkar et al. 2014). در مطالعات دیگر ۷۴۳۹ نشانگر ریزماهوره در گیاه مریم گلی (Ali et al. 2017) همچنین ۴۸۰۰ نشانگر ریزماهوره در گیاه هوتیونا کورداتا شناسایی شد (Wei et al. 2014). تاکنون هیچ

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-Aleman et al. 2014). در بین جنس‌های این خانواده، جنس *Satureja* 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 فائده‌های 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، یوگونول 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 ریزماهوره‌ها

کیفیت بالا با استفاده از Trinity (نسخه ۲.۸.۵) با پارمترهای پیش فرض سرهم‌بندی نو پدید (De novo assembly) شدند (Haas et al. 2011; Grabherr et al. 2013). توالی‌های فاقد بیان یا 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 ۲ bowtie، با پارمترهای 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. پارمترهای 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 (Nr) و Swiss-Prot (Consortium 2014) با در نظر گرفتن حد آستانه e-value مساوی 10^{-5} مورد هم‌ردیفی قرار گرفت (Park et al. 2019). 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) (<https://www.genome.jp/kaas->) (KASS) (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.

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 25°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 -80°C نگهداری شدند.

RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگی با استفاده از بافر تریزول (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 پلتفرم Illumina HiSeq ۲۵۰۰ 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

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 سرهم‌بندی استفاده شد. پس از سرهم‌بندی، به ترتیب، ۹۸/۴۸ و ۹۸/۴۱ درصد از خوانش‌ها به‌طور صحیح با رونوشت‌های سرهم‌بندی شده مرزه خوزستانی و رشینگری هم‌رديف شدند که این مقدار نشان‌دهنده کیفیت خوب سرهم‌بندی انجام شده است (Mousavi et al. 2014).

نتایج سرهم‌بندی خوانش‌ها

نتایج حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌ها نشان داد که به ترتیب ۲۷۱۹۰۷ و ۲۲۵۵۳۴ رونوشت در مرزه خوزستانی و رشینگری به دست آمد. میانگین طول رونوشت‌ها در مرزه خوزستانی و رشینگری به ترتیب ۱۰۷۹ و ۱۰۱۸ جفت‌باز بود. میزان N50 در کانتیگ‌های ایجاد شده برای مرزه خوزستانی و رشینگری با کاربرد k-mer مساوی ۲۵، به ترتیب N50=۱۸۰۲ bp و N50=۱۷۴۰ بود. این ترانسکرپتوم مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری بالاتر از N50 در مطالعات قبلی در دیگر گیاهان این خانواده مانند مریم گلی (bp) (۱۳۴۰) (Zhou et al. 2017) و دراکوسپالوم تنگوتیکوم (bp) (۱۱۱۸) (Li et al. 2017) بود.

شناسایی نشانگرهای ریزماهوره

در این بررسی مکان‌های ریزماهوره در گیاه مرزه خوزستانی و رشینگری با استفاده از توالی‌های ترانسکرپتوم ردیابی شدند. نتیجه استخراج بیوانفورماتیکی SSRها در جدول ۱ خلاصه شده است. در مطالعه حاضر، از میان ۱۷۷۱۵۴ و ۱۵۳۳۴۱ رونوشت مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری، به ترتیب ۴۴۶۲۴ (۲۵/۱۹ درصد) و ۳۴۵۴۶ (۲۳/۱۸ درصد) توالی حاوی SSR با اندازه ۱ تا ۶ نوکلئوتید بودند. این میزان با پژوهش‌های گذشته به‌منظور شناسایی توالی حاوی SSR از روی ترانسکرپتوم 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 به دلیل 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 ترانسکرپتوم برای گیاهان دارویی *Panax ginseng* (Wu et al. 2011)، *Salvia miltiorrhiza* (Deng et al. 2009) 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 ۲۴۳۰۹ (۷۰/۳۶ درصد) رونوشت برای مرزه رشینگری دارای تنها یک ریزماهوره و ۱۲۸۷۴ (۲۸/۸۵ درصد) برای مرزه خوزستانی و ۱۰۲۳۷ (۲۹/۶۳ درصد) رونوشت برای مرزه رشینگری دارای دو یا تعداد بیشتری ریزماهوره بودند.

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

مرزه رشینگری	مرزه خوزستانی	
۱۵۳۳۴۱	۱۷۷۱۵۴	تعداد کل توالی‌های بررسی شده
۱۶۱۵۲۹۸۲۶	۲۲۹۶۰۲۴۸۶	اندازه توالی‌های بررسی شده (bp)
۴۸۸۸۰	۶۲۵۲۸	تعداد کل SSRهای شناسایی شده
۳۴۵۴۶	۴۴۶۲۴	تعداد توالی‌های حاوی SSR
۱۰۲۳۷	۱۲۸۷۴	تعداد توالی‌های حاوی بیش از یک SSR

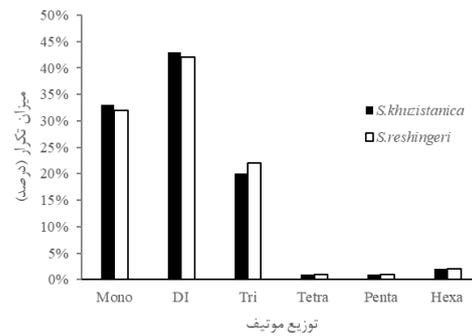
تعداد SSRهای مرزه خوزستانی در همه‌ی انواع تکرارها از SSRهای مرزه رشینگری بیشتر بودند اما درصد SSR تقریباً یکسان بود (شکل ۱). در دو گونه، ریزماهوره‌های دو نوکلئوتیدی (۴۲ درصد) و پس از آن به ترتیب تک (۳۲ درصد) و سه‌تایی (۲۲ درصد) فراوان‌ترین موتیف بودند. انواع نوکلئوتیدهای چهار، پنج (۱ درصد) و شش‌تایی (۲ درصد) کمترین فراوانی را نشان دادند (شکل ۱).

(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 به خود اختصاص دادند (شکل ۲ و جدول ۲).

جدول ۲- 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

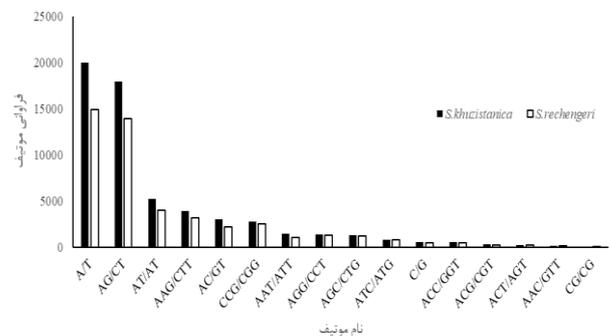
در میان موتیف‌های تکراری تک نوکلئوتیدی، تکرارهای A/T (مرزه خوزستانی: ۹۶/۹۰ درصد و مرزه رشینگری: ۹۷ درصد) فراوان‌تر از تکرارهای C/G بودند (Feng et al. 2017). فراوان‌ترین تکرار سه نوکلئوتیدی، AAG/CTT (مرزه خوزستانی: ۲۹/۹۲ درصد و مرزه رشینگری: ۲۸/۲۴ درصد) بود و مشابه گزارش‌های موجود در *Stylosanthes guianensis* (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 به ترتیب تکرار دو نوکلئوتیدی (۴۴/۱۳۲ درصد)، سپس تک نوکلئوتیدی (۲۴/۱۳) درصد) و سه نوکلئوتیدی (۲۳/۸۱ درصد) بیشترین تعداد تکرار را به خود اختصاص دادند. موتیف‌های تکراری پنج نوکلئوتیدی



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

این نتایج مشابه نتایج به دست آمده از بررسی ترانسکرپتوم گیاه *Ocimum sanctum* و *Ocimum basilicum* (اعضای یک خانواده) بوده که تکرارهای دو نوکلئوتیدی و سپس سه نوکلئوتیدی به عنوان فراوان‌ترین نوع موتیف گزارش شده است (Rastogi et al. 2014). نتایج مشابهی در برخی گیاهان دولپه‌ای دیگر مانند گیاه مدل آریدوپسیس 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 جدول ۲).



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

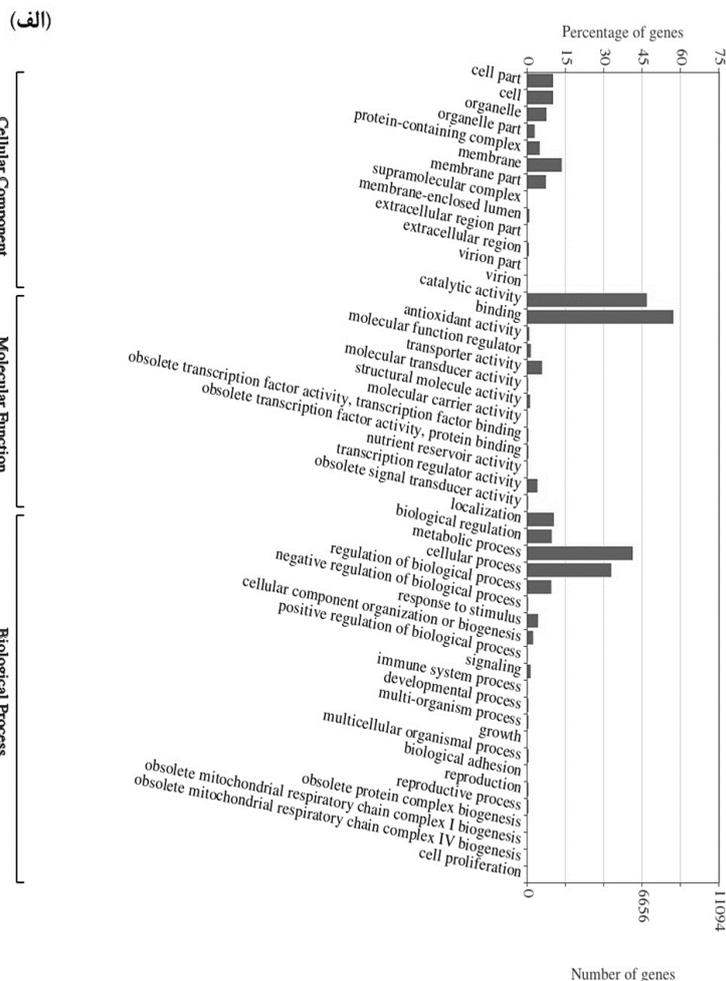
که با نتایج قبلی به دست آمده از بررسی ترانسکرپتوم گیاه *Alismatifolia* (Feng et al. 2017)، *Zanthoxylum bungeanum* (Asp et al. 2007) و *Curcuma* (Taheri et al. 2019) و مریم گلی (Taheri et al. 2019) مشابه می‌باشد. همچنین در نتایج حاصل از بررسی ترانسکرپتوم گیاه *Salvia officinalis*، تکرارهای دو نوکلئوتیدی AG/CT بیشترین موتیف‌های شایع در همه SSRها تشخیص داده شد (Ali

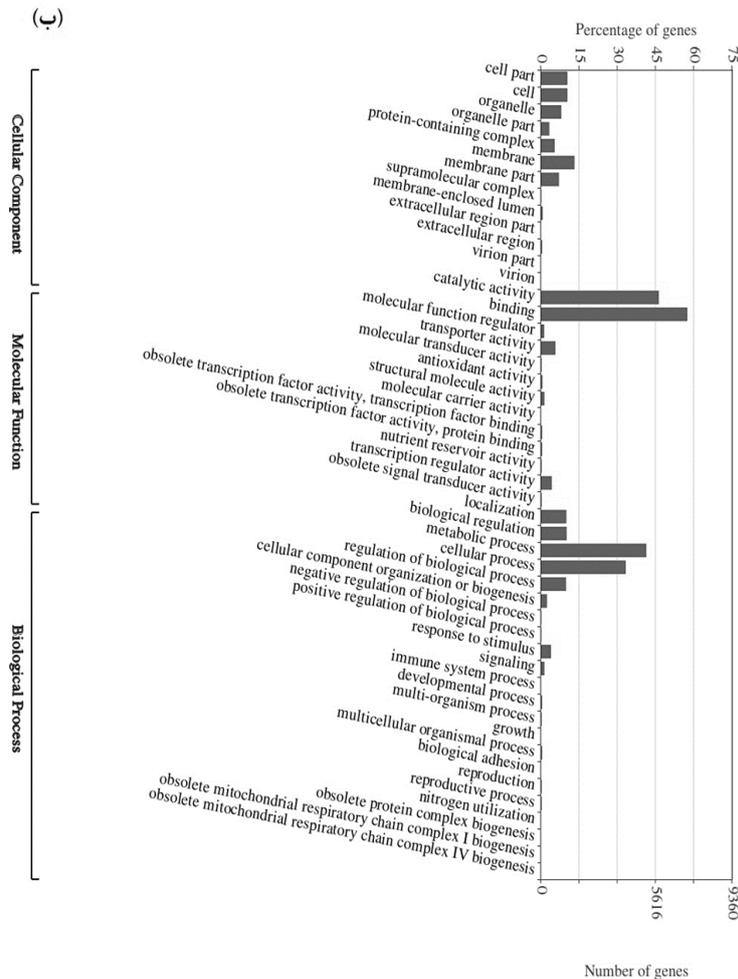
دارای حداقل فراوانی (۰/۳۵ درصد) بودند (Ali et al. 2017). فراوانی تکرارهای سه نوکلئوتیدی AAG/CTT به عنوان ویژگی خاص دو لپه‌ای‌ها مشاهده شده است (Kumpatla 2004)، که این نتایج مطالعه حاضر را پشتیبانی می‌کند. موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی دارای کم‌ترین فراوانی در بین کل موتیف‌ها بودند. با افزایش میزان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

تفسیر کارکردی رونوشت‌های حاوی ریزماهوره

نتایج بلاست رونوشت‌های دارای نشانگر SSR در برابر پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری (Non-redundant) Nr نشان داد که

در مجموع، ۱۴۷۹۲ (۳۳/۴ درصد) و ۱۲۴۸۰ (۳۶/۱۲ 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).





شکل ۳- نمودار دسته‌بندی کارکردی رونوشت‌های حاوی ریزماهواره الف) مرزه خوزستانی ب) مرزه رشینگری

پس از آن گروه کارکردی سلول (GO:0005623، مرزه خوزستانی: ۱۰ درصد، مرزه رشینگری: ۱۰/۳ درصد) بود. در گیاه مرزه خوزستانی بیشترین موتیف تکرار شده ۱ تا ۶ نوکلئوتیدی در ژن‌های گروه کارکردی غشایی شامل 13(A)، 6(AG)، 5(CGC)، 5(TTAA)، 4(AAAAG) و 5(TTCTTG) و در گیاه مرزه رشینگری شامل 12(A)، 6(AG)، 5(CCG)، 5(TTCT)، 4(CATAA) و 4(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: ۵۷/۱ درصد و مرزه رشینگری: ۵۷/۴ درصد) و پس از آن فعالیت‌های کاتالیتیکی (Catalytic activity) (GO:0003824، مرزه خوزستانی: ۴۶/۷ درصد و مرزه رشینگری: ۴۶/۲ درصد) بیش‌ترین فراوانی را به‌خود اختصاص

در حوزه فرآیند زیستی، بیشترین تعداد GO مربوط به گروه کارکردی فرآیند متابولیکی (Metabolic process) (GO:0008152، مرزه خوزستانی: ۴۱/۲ درصد و مرزه رشینگری: ۴۱/۳ درصد) بود. در گیاه مرزه خوزستانی، بیشترین موتیف ۱ تا ۶ نوکلئوتیدی تکرار شده در ژن‌های گروه فرآیند متابولیکی شامل 12(A)، 20(CT)، 5(AAT) و 4(AAAAG) و در گیاه مرزه رشینگری موتیف‌های 13(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: ۱۳/۴ درصد، مرزه رشینگری: ۱۳/۱ درصد) و

ثانویه اختصاص داده شدند. مسیرهای KEGG pathway Global and overview شناسایی شده در مرزه خوزستانی و رشینگری، در جدول ۳ نشان داده شده است. به طور کلی در این مطالعه، نشانگرهای اختصاصی SSR بر اساس داده های توالی یابی ترانسکریپتوم شناسایی شد و توزیع آن ها 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 می تواند پایه ای برای بررسی تنوع ژنتیکی، نقشه برداری ژنتیکی و انتخاب به کمک مارکر در مرزه خوزستانی و رشینگری باشد. این مطالعه می تواند برنامه های اصلاح مولکولی در مرزه خوزستانی و رشینگری و همچنین سایر گونه های جنس *Satureja* با ارزش اقتصادی و دارویی را تسهیل کند.

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)، به طوری که گروه کارکردی اتصال بیشتر فراوانی را در حوزه عملکرد مولکولی به خود اختصاص داد. در گیاه مرزه خوزستانی بیشترین موتیف تکرار شده ۱ تا ۶ نوکلئوتیدی در ژن های گروه کارکردی اتصال، موتیف های 12(A)، 6(CT)، 5(GAA)، 5(TTAA)، 4(TGAGG) و 4(GAGAAA) و در گیاه مرزه رشینگری موتیف های 12(A)، 6(TC)، 5(CGG)، 5(AAAG)، 4(CCTCA) و 4(CCCCGG) بودند. مستندسازی رونوشت های دارای نشانگر SSR در مقابل پایگاه داده KEGG حاکی از شناسایی ۴۰۱ مسیر مختلف KEGG در مرزه خوزستانی و رشینگری می باشد که شامل گروه های متابولیسم، پردازش اطلاعات ژنتیکی، فرآیندهای سلولی، پردازش اطلاعات محیطی و سایر موارد می باشند. بیشتر رونوشت ها به مسیرهای متابولیکی و پس از آن مسیر بیوسنتز متابولیت های

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

مسیرهای KEGG	Ko عدد	تعداد ژن شناسایی شده در مرزه خوزستانی	تعداد ژن شناسایی شده در مرزه رشینگری
مسیرهای متابولیکی	۰۱۱۰۰	۶۱۰	۶۱۳
بیوسنتز متابولیت های ثانویه	۰۱۱۱۰	۳۲۸	۳۲۹
متابولیسم میکروبی در محیط های مختلف	۰۱۱۲۰	۱۱۳	۱۱۳
متابولیسم کربن	۰۱۲۰۰	۷۳	۷۴
متابولیسم ۲-اکسی کربوکسیلیک اسید	۰۱۲۱۰	۱۸	۱۹
متابولیسم اسیدهای چرب	۰۱۲۱۲	۱۹	۱۹
بیوسنتز اسیدهای آمینه	۰۱۲۳۰	۶۵	۶۹
بیوسنتز کوفاکتورها	۰۱۲۴۰	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

- 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, Etmnani 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*'s) 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 Science* 7:1129.
- 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, Ghattay 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 Biology* 84:159-171.
- Park S, Son S, Shin M, Fujii N, Hoshino T, Park S (2019). Transcriptome-wide mining, characterization, and

- 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 atropatana* 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, Rafei 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, Paniago 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-Aleman 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.