مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲
صفحه ۲۴۰-۲۲۶

10.61186/gebsj.12.2.226

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 12, Number 2, Pages: 226-240

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

توسعه نشانگرهای مولکولی EST-SSR مرتبط با مسیرهای متابولیکی در گیاه کرفس کوهی

Development of EST-SSR molecular markers related to metabolic pathways in *Kelussia odoratissima* Mozaff

مریم رمضانی، فرهاد نظریان فیروزآبادی*، احمد اسماعیلی، سید سجاد سهرابی

Maryam Ramezani, Farhad Nazarian-Firouzabadi*, Ahmad Ismaili, Seyed Sajad Sohrabi

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

Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email nazarian.f@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۲۴)
Received: 2023/08/7 | Accepted: 2023/09/15 | Published: 2024/03/14

چکیده

کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و در معرض انقراض ایران است. کرفس کوهی نه‌تنها به‌عنوان یک سبزی ارزشمند به‌صورت خام مورد استفاده قرار می‌گیرد، بلکه دارای خواص درمانی بسیاری هم در طب سنتی و هم در ترکیبات داروهای گیاهی مدرن از منظر فارماکولوژیکی است. فقدان اطلاعات تنوع ژنتیکی و همچنین عدم شناخت سازوکار تولید متابولیت‌های مهم در این گیاه، تحقیقات ژنتیکی پیرامون این گیاه را با چالش مواجهه کرده است. در پژوهش حاضر، با هدف توسعه نشانگرهای EST-SSR در مقیاس بالا، از فرآیند سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه حاصل از فناوری توالی‌یابی نسل جدید استفاده شد. تعداد ۷۵۷۵ مکان ریزماهواره در ۶۳۸۸ یونی‌ژن در ترنسکریپتوم کرفس کوهی 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 ۷۹/۷۴ درصد از رونوشت‌ها دارای حداقل یک رکورد در پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری بودند. جستجوی عوامل رونویسی، تفسیر کارکردی و همچنین مستندسازی رونوشت‌ها در برابر پایگاه KEGG، اکثر یونی-ژن‌های حاوی ریزماهواره را در مسیرهای متابولیکی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دخیل دانست. نتایج حاصل نشان داد که این نشانگرها به تحلیل تنوع ژنتیکی و مسیرهای متابولیکی این گیاه کمک می‌کنند، اطلاعاتی که می‌تواند در حفظ و بهره‌برداری پایدار از این گیاه با اهمیت تلقی شوند.

واژه‌های کلیدی

تفسیر کارکردی،
تنوع ژنتیکی،
کرفس کوهی،
نسل جدید توالی‌یابی،
نشانگر مولکولی

Ramezani M, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A, Sohrabi S S. Development of EST-SSR molecular markers related to metabolic pathways in Kelussia odoratissima Mozaff. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2) :226-240. Doi: 10.61186/gebsj.12.2.226
URL: http://gebsj.ir/article-1-470-fa.html

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 2, 2024

Abstract

Kelussia odoratissima Mozaff, is one of the most important medicinal plants in Iran and is facing the risk of extinction. Keluss is not only used as a valuable herb in its raw form but also possesses numerous therapeutic properties in traditional medicine and modern herbal drug combinations from a pharmacological perspective. However, the lack of information on its genetic diversity and the mechanisms of important metabolite production in this plant pose challenges for genetic research on this species. In the present study, with the aim of developing high-throughput EST-SSR markers, the assembly process of short reads obtained through next generation sequencing technology was employed. A total of 7575 microsatellite loci were identified in 6388 unigenes. Among these markers, dinucleotide motifs followed by trinucleotide and mononucleotide motifs exhibited the highest abundance. Blast analysis of the sequences containing microsatellites revealed that 79.74% of the transcripts had at least one record in the non-redundant protein database. Further investigations involving transcription factors and functional annotations indicated that most of the microsatellite-containing unigenes are involved in metabolic pathways and the biosynthesis of secondary metabolites. The results showed that these markers assist in the analysis of genetic diversity and metabolic pathways of this plant, information that can be crucially important for the conservation and sustainable utilization of this valuable plant.

Keywords: Functional annotation, Genetic diversity, Keluss, Molecular marker, Next-Generation Sequencing

مقدمه

توالی‌های تکراری ساده (Simple Sequence Repeats: SSRs)، به‌عنوان یک ابزار مولکولی مؤثر، به‌طور مکرر در سنجش تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم گیاهی، نقشه‌برداری ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی (Quantitative trait locus: QTL) در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Xu *et al*., 2023; Niksiar *et al*., 2018). نشانگرهای SSR با میزان بالای چندشکلی، تشخیص آسان، تکرارپذیری بالا، توارث هم‌بارز و اختصاصی بودن، یکی از پر اطلاعات‌ترین نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های بهنژادی به‌شمار می‌روند (Powell *et al*., 1996). با توجه به ایرادهای نشانگر SSR سنتی از جمله هزینه بالا، زمان‌بر بودن و کار آزمایشگاهی نسبتاً زیاد، امروزه استفاده از نشانگرهای SSR مبتنی‌بر برچسب‌های توالی‌های بیان شونده (Expressed Sequence Tags-SSR: EST-SSR)، رونق بیشتری دارند، زیر این رویکرد ظرفیت بالاتری در به‌دست آوردن اطلاعاتی از توالی‌های کدکننده در شرایط محیطی یا مراحل رشدی مختلف یک گیاه دارد (Durand *et al*., 2010).

از آنجایی که ESTها با DNAهای کد کننده تطابق دارند، توالی‌های کناری که نشانگرهای مبتنی‌بر آن‌ها هستند، در مناطق حفاظت‌شده بین گونه‌های مختلف گیاهی شناخته می‌شوند. از این‌رو EST-SSRها را می‌توان به‌عنوان نشانگرهای انتخابی برای نقشه‌برداری مقایسه‌ای و انتخاب ژن‌های عملکردی استفاده نمود (Dutta *et al*., 2022; Peng *et al*., 2021). تا چند سال پیش، گسترش نشانگرهای وابسته به ژن محدود به برخی از گونه‌های زراعی بود که اطلاعات مربوط به توالی‌یابی EST آن‌ها در پایگاه‌های داده ثبت می‌شد. با این حال، امروزه با توسعه روش‌های توالی‌یابی نسل جدید (Next Generation Sequencing: NGS)، منابع ارزشمند و ارزان قیمتی برای شناسایی و توسعه نشانگرهای مبتنی بر توالی‌های کدکننده در سایر گونه‌های گیاهی کمتر شناخته شده فاقد اطلاعات ژنومی فراهم شده است (Saina *et al*., 2021; Taheri *et al*., 2019; Zheng *et al*., 2022). توالی‌یابی نسل جدید، جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی تحلیل ترنسکریپتوم است و فرصتی کلیدی برای تحلیل پروفایل بیانی گیاهان را فراهم می‌سازد (Alves-Carvalho *et al*., 2015). علاوه‌بر این، با پیشرفت‌های قابل‌توجه ژنومیکس گیاهی و افزایش حجم اطلاعات موجود، بررسی و شناسایی ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین شبکه‌های تنظیمی آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است و با سرعت بالایی در حال انجام است (Zheng *et al*., 2022).

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff)، گیاهی چندساله، دیپلوئید (۲۲ = ۲x = ۲n) و متعلق به خانواده Apiaceae است (Akkafi *et al.*, 2014; Khanavi *et al.*, 2021). این گیاه به‌طور سنتی به‌عنوان یک فرآورده غذایی و همچنین در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ahmadi *et al.*, 2007). دو ترکیب ارزشمند شامل سیس–لیگوستیلید (Z-ligustilide) و بوتیل فتالید (Butylphthalide)، اجزای اصلی اسانس کرفس کوهی را تشکیل می‌دهند که شواهدی از تأثیر مثبت آن‌ها بر سیستم عصبی، فشارخون و کلسترول در انسان گزارش شده است (Kuang *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2004). علاوه‌بر این، در پژوهش‌های مختلف برای این گیاه دارویی اثرات ضددرد، ضدالتهاب و اضطراب، ضددیابت، ضدسرطان، محافظت‌کننده عروق و دستگاه گوارش گزارش شده است (Akbarian *et al.*, 2019; Javani & Asadi-Gharneh, 2020; Khadijeh *et al.*, 2020; Khanavi *et al.*, 2021; Mirzaei *et al.*, 2020; Torki *et al.*, 2018). هرچند کرفس کوهی در گذشته از پراکنش نسبتاً خوبی در منطقه زاگرس مرکزی برخوردار بوده است، ولی متأسفانه در سال‌های گذشته، رویشگاه‌های طبیعی آن تخریب شده و این گیاه به‌عنوان یک گونه‌ی در معرض انقراض شناخته می‌شود (Ahmadi *et al.*, 2019; Ahmadi *et al.*, 2021). ارزش اقتصادی بالای این گیاه دارویی از جمله دلایل برداشت بی‌رویه و در معرض انقراض قرار گرفتن آن است.

بهبود وضعیت ژنتیکی هر موجود زنده، به دامنه تنوع ژنتیکی آن وابسته است (Hasan *et al.*, 2021). از این رو، ارزیابی جمعیت‌های بومی در نگهداری و به‌کارگیری شایسته از ژرم‌پلاسم گیاهان نادر از جمله کرفس کوهی ضروری به نظر می‌رسد (Tanksley, 1983). برنامه‌های بهنژادی فعلی و آینده کرفس کوهی نه‌تنها نیازمند آگاهی از این تنوع‌های ژنتیکی است، بلکه وابسته به نگهداری و مدیریت صحیح تنوع ژنتیکی در تمام رویشگاه‌های این گیاه است. بررسی تنوع ژنتیکی، بهنژادگران گیاهی را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف بهنژادی مهم آن یاری می‌کند و مطالعه الگوپذیری تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی ژنوتیپ‌ها، نشان دهنده سازگاری‌های احتمالی آن‌ها با محیط‌های متفاوت است (Gostimsky *et al.*, 2005). اگرچه نشانگرهای مورفولوژیک همچنان به‌عنوان مبنا و اولین مرحله در بررسی پتانسیل ژنتیکی ژرم‌پلاسم و طبقه‌بندی توده‌های بومی کرفس کوهی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما اغلب به‌تنهایی نمی‌توانند برای شناسایی روابط ژنتیکی این گیاه استفاده شوند (Mercati *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2021; Schluttenhofer & Yuan, 2017; Wang *et al.*, 2021).

فقدان اطلاعات تنوع ژنتیکی و همچنین عدم شناخت سازوکار تولید متابولیت‌های مهم در کرفس کوهی، تحقیقات ژنتیکی پیرامون این گیاه را با چالش مواجهه کرده است؛ از این‌رو در مطالعه حاضر تلاش شد تا با شناسایی و توسعه نشانگرهای EST-SSR امکان بررسی گسترده‌تر تنوع ژنتیکی در این گیاه فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی و استخراج RNA: نمونه‌های گیاهی (شامل برگ تازه گیاهان یک‌ساله و دوساله با سه تکرار، از رویشگاه طبیعی این گیاه در ارتفاعات بالای ۱۸۰۰ متر از سطح دریا در شهرستان شهرکرد روستای دره سیدی، در اواخر اسفندماه تهیه شدند. نمونه‌های گیاهی بلافاصله در ازت مایع قرار داده شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان تا زمان استخراج RNA در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول (Trizol reagent) بر اساس شیوه‌نامه شرکت سازنده (Invitrogen, life technology, USA)، از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ، در نمونه انجام شد. سپس کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل (۱ درصد) الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

کنترل کیفیت و سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه: پس از دریافت داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی RNA با استفاده از پلتفرم Illumina NovaSeq 2500 به‌صورت خوانش دو طرفه (Paired-end) با طول ۱۵۰ جفت‌باز، کیفیت اولیه توالی‌ها برای همه نمونه‌ها (سه تکرار زیستی برای هر گروه) سنجیده شد. سپس به‌منظور حذف خطای احتمالی توالی‌یابی و همچنین

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰) فرآیند پیرایش توالی‌ها (Trimming) انجام و پس از کیفیت‌سنجی خوانش‌های کوتاه (Short Reads)، سرهم‌بندی نوپدید (De novo assembly) با استفاده از نرم‌افزار SOAPdenovo-Trans با تنظیم K-mer از ۲۵ تا ۱۱۵ با فاصله ۱۰ واحد و در نظر گرفتن سایر پارامترها در حالت پیش‌فرض انجام شد.

اعتبارسنجی پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده کرفس کوهی: کمیت سرهم‌بندی نوپدید با تعیین آماره‌های تعداد کانتیگ، طول بزرگ‌ترین کانتیگ، N50، طول متوسط کانتیگ‌ها و برخی از آماره‌های کیفی نظیر قابلیت نقشه‌یابی و مستندسازی شدن توسط نرم‌افزار Transrate (v1.0.3) صورت گرفت (Smith-Unna *et al.*, 2016). به‌منظور مستندسازی پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده گیاه کرفس کوهی از ابزار BLASTX نرم‌افزار NCBI (v2.6.0) Blast+ استفاده شد (Altschul *et al.*, 1997). پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده در مقابل پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری (Non-Redundant proteins; NR) با در نظر گرفتن حد آستانه معادل E-value ≤ 1.0 E^{-5} مورد هم ترازی محلی (Local BlastX) قرار گرفت.

شناسایی نشانگر ریزماهواره (SSR): شناسایی نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از نرم‌افزار MISA تحت محیط برنامه‌نویسی پرل (Perl) انجام شد. حداقل تکرار برای نشانگرهای مونو، دی، تری، تترا، پنتا و هگزا نوکلئوتیدی به‌ترتیب ۱۰، ٦، ۵، ۵، ۵ و ۵ تعیین شد و همچنین حداکثر فاصله بین دو مکان نشانگر روی یک توالی ۱۰۰ جفت‌باز تعیین شد (Dai *et al.*, 2017). توزیع فراوانی تکرارها و ترکیب مکان‌های ریزماهواره شناسایی شده، محاسبه شد.

مستندسازی و تفسیر کارکردی ژن‌های حاوی نشانگر EST-SSR: به‌منظور مستندسازی و تفسیر کارکردی توالی‌های حاوی نشانگر EST-SSR از ابزار OmicsBox استفاده شد. همچنین به‌منظور غنی‌سازی مسیرهای متابولیکی و تحلیل گروه‌های کارکردی ژن‌های حاوی نشانگر از آزمون فیشر با در نظر گرفتن سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

توالی‌یابی و کنترل کیفیت: کنترل کیفیت اولیه خوانش‌های خام و فرآیند پردازش و پالایش داده‌ها، منجر به تولید ۲٤۲۵٦۰۰٦۸ خوانش تمیز (Clean reads) از مجموع ۲۹۸۹۸۳۸۹۲ خوانش خام شد (جدول ۱). طی فرآیند پیرایش، ۱۸/۸۷ درصد از خوانش‌های کوتاه از مجموع ٦ کتابخانه RNA-seq حذف شدند. همچنین بررسی معیار کیفیت خوانش‌های باقی‌مانده (phred score) نشان داد که به‌طور میانگین ۹۷ درصد از خوانش‌های باقی‌مانده در همه نمونه‌ها، دارای معیار کیفیت بالاتر از ۳۰ هستند.

جدول ۱- آمار پایه خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکریپتوم کرفس کوهی

Table 1. Basic statistics of reads obtained from Keluss transcriptome sequencing

Sample code		Raw read count	Clean read count	Lost read counts	Lost read percent	Q30	Nucleotide count	GC content %
One-Year-Old	R1	47667122	38635262	9031860	18.95	95.49	6,914,936,791	47.34
	R2	47730332	35190166	12540166	26.27	98.34	6,860,565,483	48.96
	R3	52985612	47432806	5552806	10.48	98.34	7,616,307,128	48.96
Two-Year-Old	R1	48793542	36087796	12705746	26.04	95.6	6,964,940,326	47.4
	R2	53791644	46952496	6839148	12.71	95.91	7,674,289,433	45.08
	R3	48015640	38261542	9754098	20.31	98.33	6,850,167,323	45.97

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

جدول ۲- سنجش کمیت و کیفیت مراجع ترنسکریپتومی کرفس کوهی با k-mer چندگانه

Table 2. Quantification and quality assessment of multi-kmer assemblies of Keluss references transcriptome

Parameters	K-mer									
	25	35	45	55	65	75	85	95	105	115
Number of transcripts	324032	337445	278613	238710	194067	149798	123309	78965	70253	69379
Size of the largest transcript (nt)	83615	115668	172771	222133	124643	65606	97150	52846	35850	38681
Number of bases (nt)	103682929	108872843	101915299	93743555	85803409	76546527	69260356	57322868	52890836	40002659
Mean length of the transcripts (nt)	227.17	227.04	273.46	318.76	387.27	460.56	515.83	725.9275	511.45	569.42
Number of transcripts greater than 1kb	17569	19277	19792	19296	19259	18680	17976	16685	12176	9717
Number of transcripts with ORF	24146	25847	26685	27357	28714	30085	30831	39938	27964	23278
N90	274	281	266	251	241	275	299	319	211	234
N70	977	1097	985	778	613	646	645	587	444	484
N50	2349	2470	2093	1730	1389	1304	1221	1034	759	781
N30	50305	88567	16839	4441	2616	2266	2020	1622	1273	1249
N10	83615	115668	172771	222133	124643	54580	9417	2789	2288	2142
GC	0.452	0.450	0.449	0.451	0.453	0.458	0.462	0.46865	0.465	0.454
Score	0.20	0.22	0.24	0.25	0.24	0.24	0.27	0.49	0.35	0.37

سرهم‌بندی نوپدید: به‌منظور دستیابی به بهترین مرجع ترنسکریپتومی کرفس کوهی در این پژوهش از رهیافت سرهم‌بندی با k-mer چندگانه استفاده شد. پس از تولید فایل‌های حاصل از سرهم‌بندی ترنسکریپتوم کرفس کوهی با k-merهای ۲۵ تا ۱۱۵، به‌منظور سنجش کمیت و کیفیت و انتخاب بهترین مرجع ترنسکریپتومی از بسته نرم‌افزاری Transrate استفاده شد. نتایج بررسی کمیت و کیفیت ۱۰ فایل مرجع ایجاد شده در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که فایل مرجع ترنسکریپتومی ایجاد شده با K-mer معادل ۹۵ در مجموع با در نظر گرفتن معیارهای چندگانه کمی و کیفی بهترین گزینه (دارای بیشترین امتیاز: ۰/۴۹) برای ادامه تحلیل‌های پایین‌دستی را دارد (جدول ۲).

سرهم‌بندی رونوشت‌های کرفس کوهی با استفاده از ادغام خوانش‌های پردازش شده (Trimmed reads) در بهینه‌ترین حالت (K-mer=۹۵) منجر به ایجاد ۷۸۹۶۵ رونوشت شد. همچنین حجم کل پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده کرفس کوهی Mb ۵۷/۳۲ بود که این مقدار نیز میزان مناسبی برای ترنسکریپتوم گیاهان دیپلوئید (Mb ۸۰ – ۵۰) محسوب می‌شود (Sudheesh *et al.*, 2016).

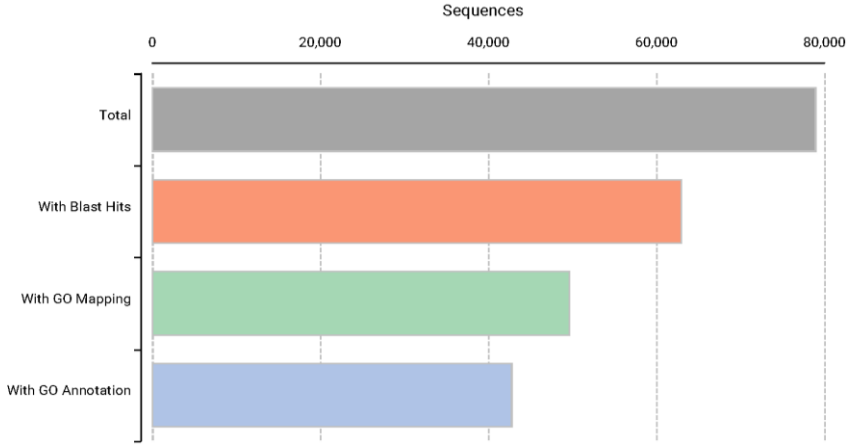
نتایج بلاست پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده علیه پایگاه NR نشان داد که ۶۲۹۷۱ (۷۹/۷۴ درصد) رونوشت با حد آستانه E-value ≤ $1.0\ E^{-5}$، دارای رکورد مشابه در پایگاه NR بودند (شکل ۱). همچنین نتایج بلاست در مطالعه حاضر نشان داد که کرفس کوهی بیشترین شباهت را با هویج (*Daucus carota subsp. sativus*) و پس از آن با گیاه ترمس (*Lupinus albus*) دارد (شکل ۲). با توجه به فقدان توالی‌های ژنی ثبت شده در پایگاه داده NCBI برای گیاه کرفس کوهی ، مستندسازی و تعیین گروه‌های کارکردی رونوشت‌های حاصله، تولید محتوا و افزایش اطلاعات ژنتیکی این گیاه ارزشمند خواهد بود.

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره: در بسیاری از پژوهش‌ها به کیفیت بالای نشانگرهای شناسایی شده با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل جدید اشاره شده و از آن‌ها به‌عنوان منبع ارزشمندی جهت توسعه نقشه‌های ژنتیکی نام برده شده است (Kaur *et al.*, 2011). نتایج این مطالعه نشان داد که در مجموع، ۷۵۷۵ مکان نشانگر SSR در ۶۳۸۸ یونی‌ژن شناسایی شد. تعداد ۹۴۴ یونی‌ژن شامل بیش از یک مکان نشانگر SSR بودند. همچنین ۶۹۱ یونی‌ژن نیز دارای موتیف‌های پیچیده SSR بودند. این میزان نشانگر شناسایی شده در ترنسکریپتوم کرفس کوهی نسبت به میزان مکان SSR شناسایی شده در گندم (۷/۴۱ درصد) و شبدر (۷/۶۰ درصد) بیشتر ولی نسبت به میزان مکان SSR شناسایی شده در قهوه (۱۸/۵ درصد) کمتر است (Zheng *et al.*, 2013).

موتیف‌های تک نوکلئوتیدی (مونو) با فراوانی ۲۶۲۷ (۳۴/۶۸ درصد) جایگاه دوم را در بین نشانگرهای شناسایی شده به خود اختصاص داد (جدول ۳). در پژوهشی که به‌منظور شناسایی نشانگرهای SSR بر روی گیاه *Herba houttuyniae*، قهوه و چای صورت گرفت، موتیف‌های "مونو" بیشترین میزان فراوانی را به

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

خود اختصاص دادند (Wang *et al.*, 2017). بیشترین میزان فراوانی موتیف‌های تک نوکلئوتیدی از نوع موتیف A/T بود. در مطالعه مشابه دیگر نیز موتیف A/T در بین موتیف‌های تک نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از ترنسکریپتوم کلزا بیشترین میزان فراوانی را نشان داد (Chen *et al.*, 2017). در برخی از مطالعات که شناسایی نشانگرها در مقیاس وسیع و مبتنی‌بر توالی‌یابی نسل جدید صورت می‌گیرد از ذکر فراوانی موتیف‌های "مونو" به‌علت وجود خطاهای دستگاه‌های توالی‌یابی چشم‌پوشی می‌شود. ترنسکریپتوم کرفس کوهی شامل توالی‌های تکراری است که نشانگرهای مبتنی‌بر آن‌ها در مناطق حفاظت‌شده گیاهان قرار می‌گیرند. این رخداد نادر به خطاهای خوانش‌ها، نرم‌افزار شناساگر نشانگرها و ساختار ژنوم گیاهان برمی‌گردد (Sudheesh *et al.*, 2016).



شکل ۱- نتایج BLASTX ترنسکریپتوم کرفس کوهی علیه پایگاه داده NR و نقشه یابی آن‌ها علیه پایگاه GO

Fig 1. BLASTX results of the Keluss transcriptome against the NR database and their annotation against the GO database.

شکل ۲- توزیع فراوانی گونه‌های با همولوژی بالا نسبت به ترنسکریپتوم کرفس کوهی. پایگاه پروتئینی هویج (*Daucus carota*) بیشترین شباهت را با ترنسکریپتوم کرفس کوهی نشان می‌دهد.

Fig 2. Frequency distribution of species with high homology to the Keluss transcriptome. The protein database of carrot (*Daucus carota*) shows the most similarity with the Keluss transcriptome.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

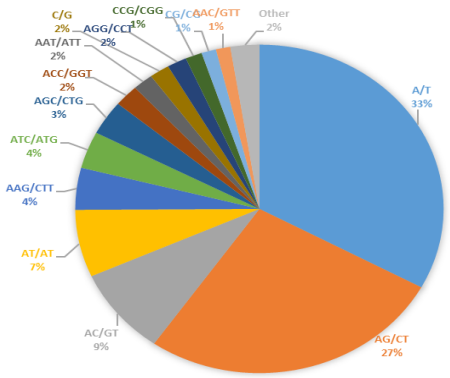
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

جدول ۳- توزیع موتیف/ تکرارهای نشانگر SSR در ترنسکریپتوم کرفس کوهی

Table 3. Distribution of SSR marker motif/repeats in Kloss transcriptome

Repeat	Motif						Total	Percentage
	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Hexa-		
5	0	0	941	34	13	19	1007	13.29
6	0	1032	343	13	2	6	1396	18.43
7	0	609	145	8	0	1	763	10.07
8	0	458	69	4	1	0	532	7.02
9	0	357	33	2	0	0	392	5.17
10	1174	240	15	0	0	0	1429	18.86
11	493	171	9	0	0	0	673	8.88
12	308	119	3	0	0	0	430	5.68
13	185	75	3	0	0	0	263	3.47
14	122	64	2	0	0	0	188	2.48
15	100	42	0	0	0	0	142	1.87
≥16	245	110	5	0	0	0	360	4.75
Total	2627	3277	1568	61	16	26	7575	100

موتیف‌های دو نوکلئوتیدی "دی" ٤٣/٢٦ درصد از کل مکان نشانگرها را به خود اختصاص دادند که در این بین، موتیف AG/CT بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص داد. شواهد به‌دست آمده از مطالعه دیگر نیز نشان داد که موتیف AG/CT در بین نشانگرهای دو نوکلئوتیدی بیشترین تکرار را در ترنسکریپتوم عدس دارد (Gupta *et al.*, 2016). در اغلب مطالعاتی که در آن‌ها فراوانی موتیف‌های ۲ تا ٦ نوکلئوتیدی بررسی شده است، موتیف ۲ نوکلئوتیدی پس از موتیف ۳ نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی را در بین موتیف‌ها دارد که از این نظر با نتایج مطالعه حاضر تطابق ندارد. موتیف دی نوکلئوتید AG/CT با ٩٤ جفت‌باز بیشترین میزان فراوانی را در بین موتیف‌های ۲ نوکلئوتیدی ترنسکریپتوم *Ipomoea batatas* را به خود اختصاص داد، که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد (Wang *et al.*, 2011). موتیف سه نوکلئوتیدی "تری" بعد از موتیف دو و تک نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی (۲۰/۷۰ درصد) را به خود اختصاص دادند (شکل ۳). تغییر در تعداد تکرار ریزماهواره‌های غیر سه نوکلئوتیدی منجر به تغییر مکانی چارچوب توالی کدکننده می‌شود؛ پس بنابراین احتمال حضور این ریزماهواره‌ها در ناحیه کدکننده کمتر است (Luro *et al.*, 2008). هرچند در برخی مطالعات نیز نتایج متفاوتی گزارش شده است. در بین موتیف‌های ریزماهواره سه نوکلئوتیدی موتیف AAG/CTT، ATC/GAT و AGC/GCT به‌ترتیب بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند (شکل ۳). بررسی نتایج سایر مطالعات مشابه نشان داد که موتیف AAG/CTT، یکی از فراوان‌ترین موتیف‌های سه نوکلئوتیدی در بین گیاهان دولپه به‌شمار می‌رود (Wang *et al.*, 2011). همچنین نشانگرهای ۳ نوکلئوتیدی با عدم تغییر قاب خوانش باز پتانسیل بالاتری جهت بررسی ژن‌های کدکننده برخوردارند، از این‌رو این موتیف برای بررسی ژن‌های کارکردی دخیل در تنش‌های غیرزیستی مؤثرتر خواهند بود (Sohrabi et al. 2018). موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی به‌ترتیب دارای فراوانی ٦١، ١٦ و ٢٦ در بین کل موتیف‌ها بودند. با افزایش میزان تعداد نوکلئوتیدها در موتیف‌ها احتمال حضور و تکرار شدن آن‌ها در ژنوم کاهش می‌یابد. موتیف‌های ACAT/ATGT، ACCCC/GGGGT و ACCATC/GATGGT به‌ترتیب در گروه موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی را نشان دادند.

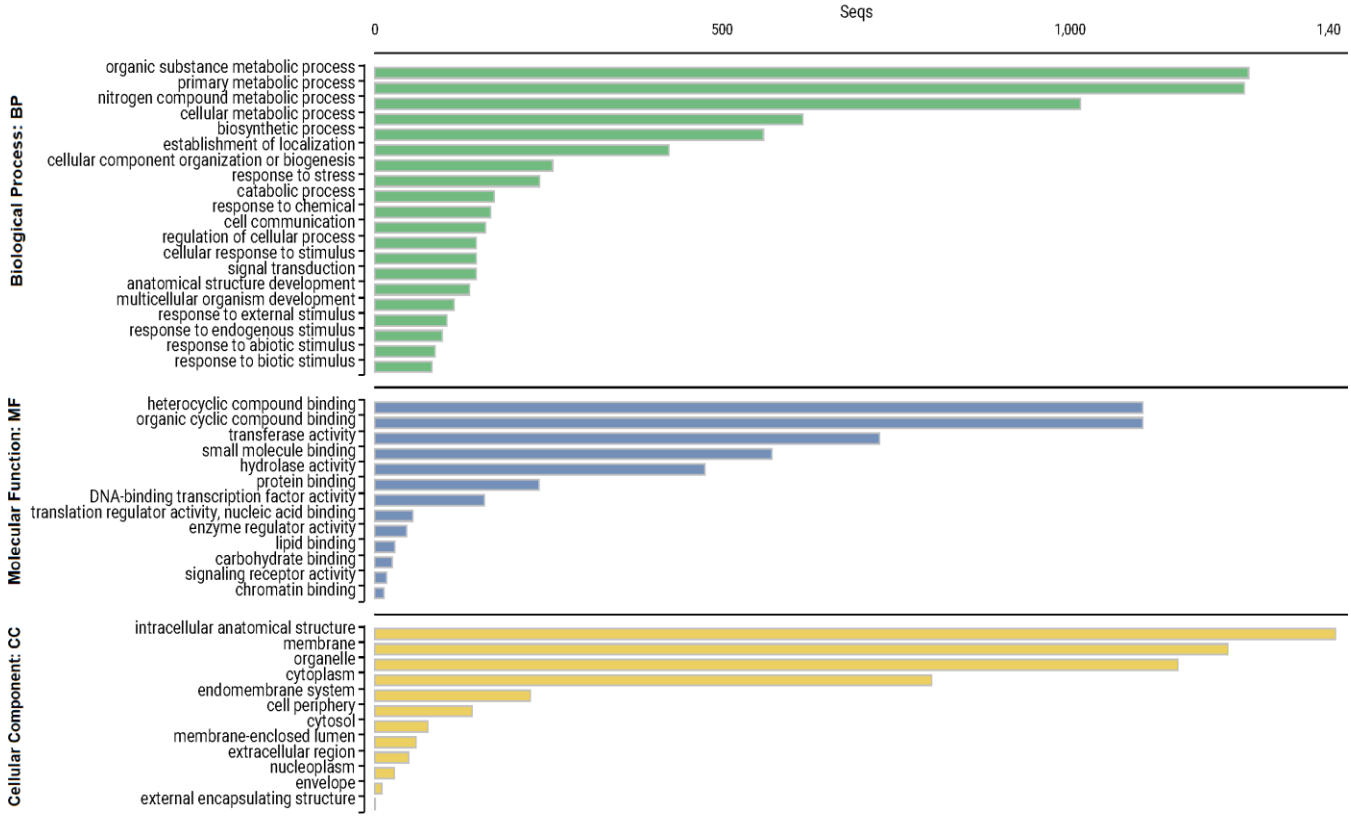


شکل ۳- توزیع موتیف/تکرارهای ریزماهواره شناسایی شده در ترنسکریپتوم کرفس کوهی

Fig 3. Distribution of identified microsatellite motifs/repeats in Keluss transcriptome

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

تفسیر کارکردی یونی‌ژن‌های حاوی ریزماهواره: هستی‌شناسی ژن (GO) از سه کلاس عملکردی اصلی شامل فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی و اجزای سلولی نشان داد که توالی‌های حاوی SSR از نظر گروه اجزای سلولی، به دنبال آن فرایندهای بیولوژیک و سپس عملکرد مولکولی برجسته‌تر بودند. ساختار تشریحی داخل سلولی، غشا، اندامک‌ها و سیتوپلاسم بخش اصلی تشکیل دهنده دسته اجزای سلولی هستند. زیرمجموعه‌های مهم فرآیندهای بیولوژیکی شامل فرآیندهای متابولیکی، فرآیند بیوسنتزی و متمرکزسازی (Localization) بودند. در بخش عملکرد مولکولی، اتصال ترکیبات هتروسیکلیک و حلقوی آلی و فعالیت ترانسفرازی طبقه‌بندی شدند. (شکل ٤). خصوصیات عملکردی ثابت کرد که نشانگرهای یافت شده نسبت بیشتری از بخش بیان شده ژنوم در *Kelussia odoratissima* را هدف قرار می‌دهند. تفسیر کارکردی یونی‌ژن‌های حاوی ریزماهواره گیاه زیره سیاه نیز که در همین خانواده جای دارد، نتایج مذکور را تائید می‌کند (Samandari-Bahraseman *et al.*, 2022). همچنین نتایج مستندسازی عملکردی ژن‌های شامل نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات مشابه نشان داد که فرآیندهای متابولیکی، بیشترین فراوانی را در طبقه گروه‌های عملکردی دارند (Li *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).



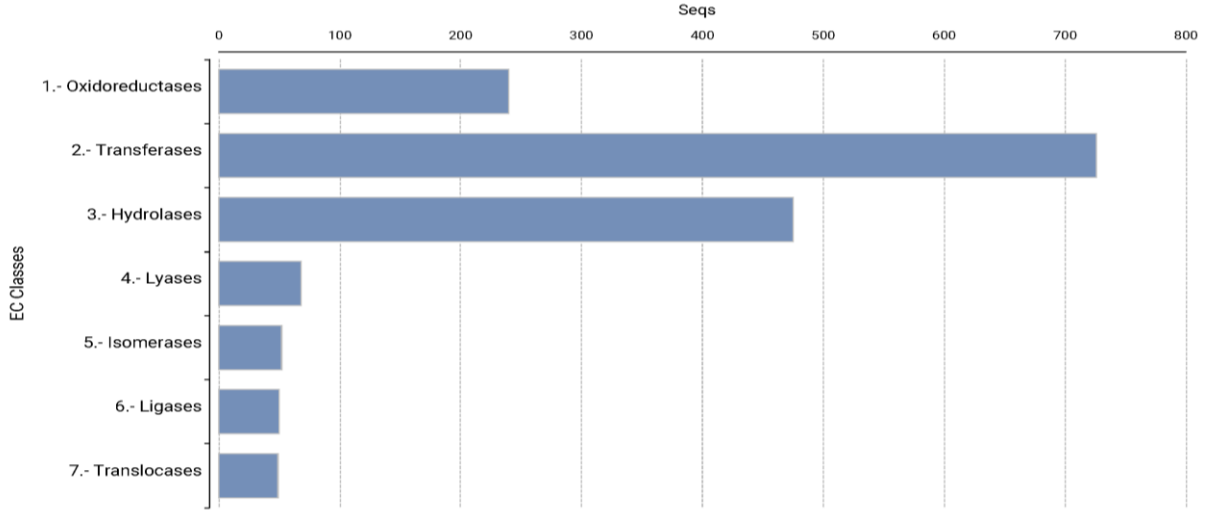
شکل ٤- تحلیل هستی‌شناسی نشانگرهای EST-SSR شناسایی شده در ترنسکریپتوم کرفس کوهی. گروه‌های کارکردی شامل فرآیندهای زیستی (BP)، عملکرد مولکولی (MF) و اجزای سلولی (CC) می‌باشد.

Fig 4. Gene ontology analysis of identified EST-SSRs markers in Keluss transcriptome. Functional groupings encompass three main categories: biological processes (BP), Molecular function (MF), and cellular components (CC).

توزیع فراوانی آنزیم‌ها: با توجه به تجزیه و تحلیل‌های صورت گرفته با استفاده از نرم‌افزار OmicsBox مشخص شد که نواحی حاوی توالی‌های EST-SSR، انواع مختلفی از آنزیم‌ها را کد کرده که بر اساس میزان فراوانی شامل آنزیم‌های ترانسفراز، هیدرولاز،

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

اکسیدردوکتاز و لیاز هستند (شکل ۵). ترانسفرازها انتقال گروه‌های عاملی مانند متیل، هیدروکسی متیل، فرمال، گلیکوزیل، آسیل، آلکیل، فسفات و گروه‌های سولفات را با استفاده از یک واکنش جانشینی نوکلئوفیل کاتالیز می‌کنند (Dixon *et al.*, 2010). درواقع ترانسفرازها، بیوکاتالیست‌هایی هستند که بیشتر در سنتز ترکیبات آلی کاربرد دارند و با افزودن مولکول‌های آب به یک بستر با استفاده از یک واکنش جایگزینی نوکلئوفیل فرایند را کاتالیز می‌کنند. هیدرولازها برای تولید واسطه‌های دارویی و آفت‌کش‌ها و سینتون‌های کایرال برای سنتز نامتقارن استفاده شده‌اند. ترکیبات سنتتیک کایرال (chiral synthetic) به ترکیباتی اشاره دارد که دارای یک اتم کربن چیره هستند و قابلیت تشکیل دو ایزومر نظیر (نسبت به انعکاس نور) را دارند. این ترکیبات به‌عنوان ترکیبات سنتتیک برای سنتز مولکول‌های پیچیده‌تر و بیشتر استفاده می‌شوند. به‌دلیل ویژگی چیرگی، این ترکیبات در سنتز مولکول‌های آلی پیچیده و مواد دارویی با ساختار کایرال بسیار مهم هستند (Grandi *et al.*, 2023). در میان هیدرولازها، آمیدازها، پروتئازها، استرازها و لیپازها از اهمیت خاصی برخوردار هستند. این آنزیم ها هیدرولیز و تشکیل استر و آمید را کاتالیز می‌کنند. پیوندها لیپازها می‌توانند تری گلیسرید را به اسیدهای چرب و گلیسرول هیدرولیز کنند. هیدرولازها به‌طور گسترده برای تولید الکل‌های فعال نوری، اسیدها، استرها و لاکتون‌ها با تفکیک جنبشی استفاده شده‌اند (Paul *et al.*, 2019). آنزیم‌های اکسید ردوکتاز واکنش‌هایی شامل وارد کردن اکسیژن، انتقال هیدرید، استخراج پروتون و سایر مراحل ضروری را کاتالیز می‌کنند. تعدادی از مسیرهای متابولیک مانند گلیکولیز، چرخه کربس، زنجیره انتقال الکترون و فسفوریلاسیون اکسیداتیو، تبدیل دارو و سم‌زدایی در کبد، فتوسنتز در کلروپلاست نیاز به دخالت مستقیم آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز دارد. علاوه بر این، تخریب مولکول‌های زیستی غیرضروری توسط اکسیدوردوکتاز کاتالیز می‌شود (Mezgebu Legesse & Etsegenet Assefa, 2020). به‌طور کلی می‌توان گفت که آنزیم‌های مذکور در تولید متابولیت‌های ثانویه، شرکت در مسیرهای اصلی بیوسنتزی و ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Czerniawski & Bednarek, 2018).



شکل ۵- توزیع فراونی توالی‌های حاوی EST-SSR کدکننده انواع مختلف آنزیم

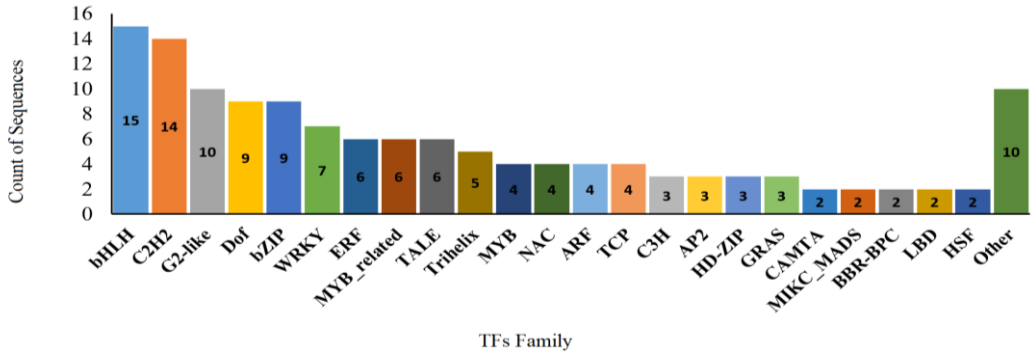
Fig 5. Frequency distribution of EST-SSR-containing sequences encoding different types of enzymes

فراوانی عوامل رونویسی: از مهم‌ترین عوامل کنترل بیان، تنظیم میزان نسخه‌برداری از ژن‌ها است که عوامل رونویسی در آن‌ها نقش مهمی دارند (Guo *et al.*, 2007). عوامل رونویسی بیان ژن را در فرآیندهای مختلف زیستی مانند رشد، نمو و سوخت و ساز انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه را تنظیم می‌کنند (Patra *et al.*, 2013). در این مطالعه از PlantTFDB برای جستجوی عوامل رونویسی کاندید ترنسکریپتوم حاوی نواحی نشانگر استفاده شد. تعداد ۱۰ گروه برتر از خانواده‌های ژنی عوامل رونویسی مربوط

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

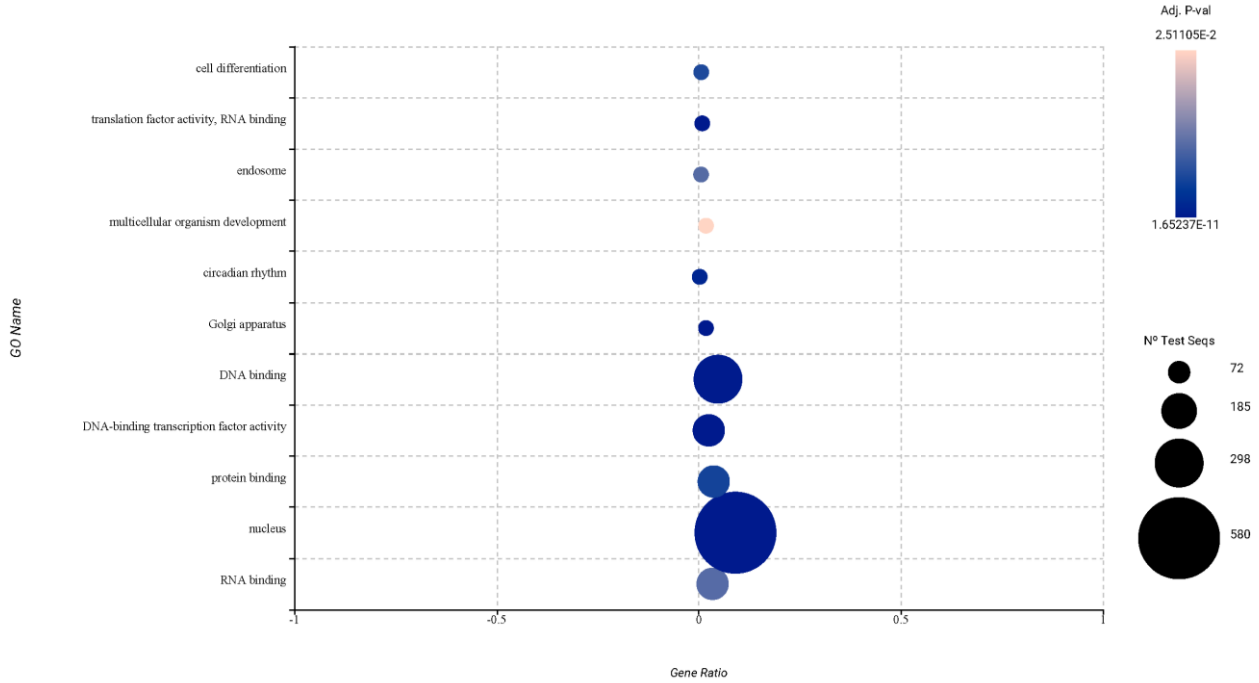
به خانواده‌های bHLH، C2H2، G2- Like، Dof، bZIP، WRKY، ERF، MYB_related، TALE، Trihelix است (شکل ٦). عوامل رونویسی bHLH و C2H2 بالاترین مقدار بیان را در بین عوامل رونویسی گیاه زنیان و هویج نشان دادند. مطالعه بر روی خانواده ژن‌های bHLH در گیاه دارویی *Salvia miltiorrhiza* و *Artemisia annua* نشان می‌دهد که برخی از اعضای این خانواده دارای نقش‌های مهم در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تولید ترکیبات دارویی هستند (Chang *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2015).

بررسی خانواده ژن‌های WRKY در گیاه دارویی *Panax ginseng* نشان داد که این عوامل در پاسخ گیاهان دارویی به تنش‌های محیطی و همچنین در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های دارویی نقش مهمی دارند (Di *et al.*, 2021). چندین عضو از پروتئین‌های خانواده AP2/ERF، bHLH، MYB، WRKY (Yang *et al.*, 2012) و NAC، DOF، bZIP و HD-ZIP به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گزارش شده‌اند (Shen *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019).



شکل ٦- توزیع فراوانی خانواده‌های عوامل رونویسی حاوی EST-SSR

Fig 6. Frequency distribution of TF families' genes containing EST-SSRs



شکل ۷-گروه‌های کارکردی غنی‌سازی شده توسط توالی‌های حاوی EST-SSR در ترنسکریپتوم کرفس کوهی. نقاط صورتی نشان دهنده مقدار P-Value کوچکتر است. اندازه گره با تعداد ژن مطابقت دارد و نقاط بزرگتر تعداد بیشتری از ژن ها با اصطلاحات GO غنی شده را نشان می‌دهد.

Fig 7. The functional groups enriched by EST-SSR-containing sequences in Keluss transcriptome. Pink dots represent lower adjusted P-Values (FDR). The node size corresponds to the number of matched genes, and larger dots indicate a higher number of genes enriched with GO terms

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

جدول ٤- مسیرهای متابولیکی دارای توالی‌های حاوی EST-SSR در ترنسکریپتوم کرفس کوهی

Tab 4. Metabolic pathways with EST-SSR-containing sequences in the Keluss transcriptome

Metabolic pathway	KO ID	Count of sequences
Purine metabolism	ko00230	136
Thiamine metabolism	ko00730	114
Glycolysis / Gluconeogenesis	ko00010	54
Starch and sucrose metabolism	ko00500	41
Pyruvate metabolism	ko00620	34
Pentose and glucuronate interconversions	ko00040	31
Glycerophospholipid metabolism	ko00564	30
Fructose and mannose metabolism	ko00051	29
Carbon fixation in photosynthetic organisms	ko00710	28
Cysteine and methionine metabolism	ko00270	27
Methane metabolism	ko00680	26
Galactose metabolism	ko00052	23
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00520	23
Pentose phosphate pathway	ko00030	22
Citrate cycle (TCA cycle)	ko00020	21
Oxidative phosphorylation	ko00190	21
Drug metabolism - other enzymes	ko00983	20
Glutathione metabolism	ko00480	19
Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	18
Glycerolipid metabolism	ko00561	18
Porphyrin and chlorophyll metabolism	ko00860	18
Ascorbate and aldarate metabolism	ko00053	16
Carbon fixation pathways in prokaryotes	ko00720	16
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	ko00980	15
Drug metabolism - cytochrome P450	ko00982	15
Glycine, serine and threonine metabolism	ko00260	14
Other glycan degradation	ko00511	13
Fatty acid biosynthesis	ko00061	13
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	ko00130	13
Tryptophan metabolism	ko00380	12
Inositol phosphate metabolism	ko00562	12
Propanoate metabolism	ko00640	12
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ko00400	12
Lysine degradation	ko00310	11
Arginine and proline metabolism	ko00330	11
Tyrosine metabolism	ko00350	11
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00630	11
Sphingolipid metabolism	ko00600	10
Photosynthesis	ko00195	10
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ko00250	10
Other (77 pathways)		291

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی: غنی‌سازی کارکردی از لحاظ در برگرفتن بیشترین میزان یونی‌ژن‌های حاوی SSR به سه گروه به‌ترتیب اجزای سلولی، عملکرد مولکولی و فرایندهای زیستی تقسیم می‌شود (شکل ۷). از عناصر اصلی اجزای سلولی می‌توان به هسته، اندام گلژی و اندوزوم، از زیرمجموعه‌های عملکرد مولکولی به اتصال DNA، RNA و پروتئین و از دسته‌ی فرایندهای زیستی به تمایز سلولی، ریتم‌های شبانه‌روزی و توسعه اندام‌های چند سلولی اشاره کرد (شکل ۷). در گیاهان زیره سیاه و زنیان دسته‌بندی غنی‌سازی کارکردی مشابهی مشاهده شد (Samandari-Bahraseman *et al*., 2022; Soltani Howyzeh *et al*., 2019).

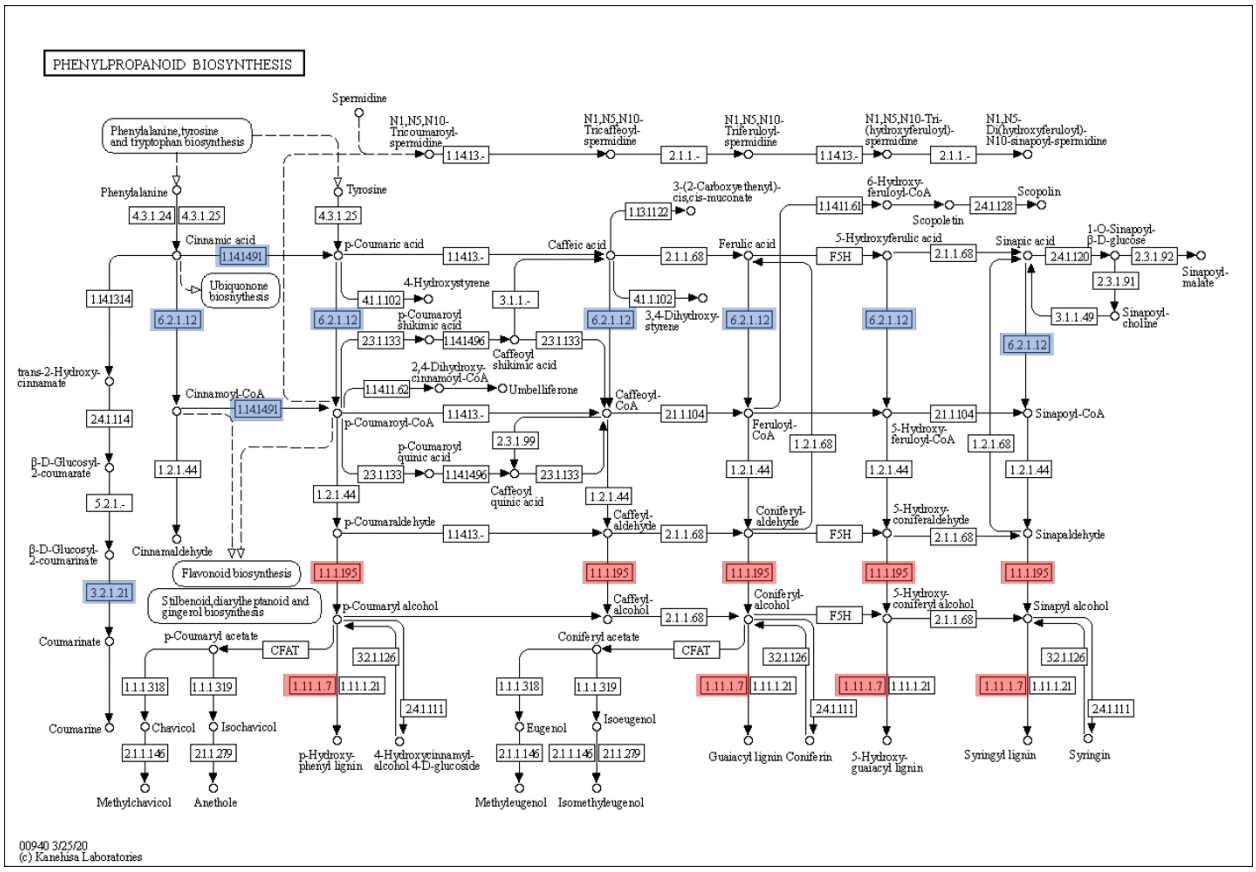
آنالیز KEGG: مستندسازی رونوشت‌های دارای نشانگر SSR در مقابل پایگاه داده KEGG منجر به شناسایی ۱۲۷۰ ژن منحصر به فرد در ۱۱۷ مسیر متابولیکی مختلف KEGG در گیاه کرفس کوهی شد (جدول ٤) که در این بین، گروه‌های سوخت و ساز، گلیکولیز و گلوکونئوژنز (Gluconeogenesis)، تبدیل پنتوز و گلوکورونات، تثبیت کربن، مسیر پنتوز فسفات دیده می‌شوند.

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]



شکل ۸- نقشه‌یابی و بررسی بیان توالی‌های حاوی EST-SSR دخیل در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید. رنگ قرمز و آبی به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان آنزیم مشخص شده در مقایسه گیاه یک‌ساله نسبت به گیاه دوساله را نشان می‌دهد.

Fig 8. Mapping and expression analysis of EST-SSR-containing sequences involved in the phenylpropanoid biosynthesis pathway. The red and blue colors indicate up- and down-regulation of the specified enzyme expression in comparison between annual and biennial plants, respectively

بیشتر رونوشت‌ها به مسیرهای متابولیکی و پس از آن مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه اختصاص داده شدند. مسیر سوخت و ساز پورین که بیشترین تعداد رونوشت را به خود اختصاص داد، شامل مسیر بیوسنتزی پورین از نو، مسیر احیا و تجزیه پورین است. مسیر بیوسنتزی پورین از شش آنزیم برای کاتالیز تبدیل فسفریبوزیل پیروفسفات (PRPP) به اینوزین ۵'-مونوفسفات (IMP) از طریق ۱۰ مرحله بسیار حفاظت‌شده استفاده می‌کند (Yin *et al.*, 2018). مسیر متابولیکی تیامین نیز که مقادیر بالایی از رونوشت‌های توالی‌یابی شده را شامل شده، نقش محوری در مسیر پنتوز فسفات دارد که نه‌تنها یک مسیر سوخت و ساز گلوکز جایگزین است، بلکه یک مسیر اصلی برای سنتز چندین انتقال‌دهنده، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها، اسیدهای آمینه، استروئیدها و گلوتاتیون است (Fernandes *et al.*, 2017).

مسیر فنیل پروپانوئید: به‌منظور شناسایی مسیرهای با بیان متفاوت بین گیاهان یک‌ساله و دوساله اطلاعات توالی‌های رونوشت‌های با بیان متفاوت به‌دست آمده، در پایگاه داده‌ی KEGG بارگذاری شد. نتایج حاصل از این بررسی، تفاوت در بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید به‌دست آمد. در این بررسی بیان ژن‌های ترانس سینامات ٤-مونوکسیژناز، ترانس سینامات و بتاگلوکوزیداز در مقایسه گیاه یک‌ساله نسبت به گیاه دوساله افزایش بیان و ژن‌های ٤- کوماریل الکل و هیدروژ پراکسید اکسیدوردوکتاز کاهش بیان نشان داد (شکل ۸). این آنزیم‌ها به‌صورت کلیدی در مسیرهای بیوشیمیایی ترکیبات فلاونوئیدی درگیر بوده و در بحث زیست تبدیلی ترکیبات فنیل پروپانوئیدی حائز اهمیت هستند (Ashengroph & Nahvi, 2014). در پژوهشی مشابه بیان ژن‌های مسیر فنیل پروپانوئید در بافت‌های مختلف، افزایش بیان در گل نسبت به برگ مشاهده شد (Majdi *et al.*, 2014). همچنین در

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

گیاه بابونه بیان این ژن‌ها در برگ‌های جوان بیشتر از برگ‌های به‌طور کامل گسترش یافته گزارش شد (Majdi *et al*., 2014).

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش از فناوری توالی‌یابی با عملکرد بالا برای تحلیل سطح بیان رونوشت‌های گیاهان یک و دوساله کرفس کوهی استفاده شد و در آن یونی‌ژن‌ها بر اساس هستی‌شناسی عملکردی و غنی‌سازی مورد بررسی قرار گرفته و نشانگرهای SSR با موفقیت شناسایی شدند. یافته‌های این پژوهش شامل شناسایی ۷۵۷۵ مکان ریزماهواره در ٦٣٨٨ یونی‌ژن در ترنسکریپتوم کرفس کوهی بود. 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 ۷۹/۷٤ درصد از رونوشت‌ها دارای حداقل یک رکورد در پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری بودند. علاوه‌بر این نتایج حاصل نشان داد که این نشانگرها به تحلیل تنوع ژنتیکی و مسیرهای متابولیکی این گیاه کمک می‌کنند، اطلاعاتی که می‌تواند در حفظ و بهره‌برداری پایدار از این گیاه با اهمیت تلقی شوند. همچنین یافته‌های این مطالعه می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای نقشه‌برداری ژنتیکی و انتخاب به کمک نشانگر (Marker-assisted selection: MAS) در گیاه کرفس کوهی و سایر گیاهان دارویی نزدیک به این گونه محسوب شود.

منابع

Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. Food Chemistry, 105(1), 57-64. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.056

Ahmadi, K., Omidi, H., Amini Dehaghi ,M., & Naghdi Badi, H. (2019). A Review on the Botanical, Phytochemical and Pharmacological Characteristics of Kelussia odoratissima Mozaff. Journal of Medical Internet Research, 18(72), 30-45 (In Persian). Doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.30

Ahmadi, K., Omidi, H., Amini Dehaghi ,M., & Soltani, E. (2021). Evaluation of dormancy breaking treatments on seed germination and soluble compounds of Kelussia odoratissma Mozaff. seedling. Plant Physiology Reports, 26(3), 513-525. Doi: 10.1007/s40502-021-00594-0

Akbarian, A., Rahimmalek, M., Sabzalian, M. R., & Sarfaraz, D. (2019). Variation in essential oil composition, phenolic, flavonoid and antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff based on three model systems. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 13, 100208. Doi: 10.1016/j.jarmap.2019.100208

Akkafi, H. R., Valivand, M., & Jenabi, T. (2014). Autecological, palynological and karyological characterization of Kelussia odoratissima Mozaff. (A case study in Dare Sepestan region from Fereydoon shahr in Isfahan province). Iranian Journal of Plant Biology, 6(19), 125-140 (In Persian). https://dorl.net/dor/20.1001.1.20088264.1393.6.19.10.1

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25(17), 3389-3402. http://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389

Ashengroph, M., & Nahvi, I. (2014). Biological Production of Natural Vanillin Based on the Microbial Conversion of Phenylpropanoids. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 27(3), 316-334 (In Persian). https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832738.1393.27.3.1.3

Chang, S., Li, Q., Huang, B., Chen, W., & Tan, H. (2023). Genome-wide identification and characterisation of bHLH transcription factors in Artemisia annua. BMC Plant Biology, 23(1), 63. Doi: 10.1186/s12870-023-04063-8

Chen, J., Li, R., Xia, Y., Bai, G., Guo, P., Wang, Z., Zhang, H., & Siddique, K. H. (2017). Development of EST-SSR markers in flowering Chinese cabbage (Brassica campestris L. ssp. chinensis var. utilis Tsen et Lee) based on de novo transcriptomic assemblies. PloS One, 12(9), e0184736. Doi: 10.1371/journal.pone.0184736

Czerniawski, P., & Bednarek, P. (2018). Glutathione S-Transferases in the Biosynthesis of Sulfur-Containing Secondary Metabolites in Brassicaceae Plants. Frontiers in Plant Science, 9. Doi: 10.3389/fpls.2018.01639

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 (Basel), 8(11). Doi: 10.3390/genes8110325

Di, P., Wang, P., Yan, M., Han, P., Huang, X., Yin, L., Yan, Y., Xu, Y., & Wang ,Y. (2021). Genome-wide characterization and analysis of WRKY transcription factors in Panax ginseng. BMC Genomics, 22(1), 834. Doi: 10.1186/s12864-021-08145-5

Dixon, D. P., Skipsey, M., & Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. Phytochemistry, 71(4), 338-350. Doi: 10.1016/j.phytochem.2009.12.012

Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J.M., Vendramin, G., Sebastiani, F., Buonamici, A., Gailing, O., Koelewijn, H.P., Villani, F. & Mattioni, C. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. BMC Genomics, 11(1), 570. Doi: 10.1186/1471-2164-11-570

Dutta, H., Mishra, G. P., Aski, M. S., Bosamia, T. C., Mishra, D. C., Bhati, J., Sinha, S. K., Vijay, D., C. T, M. P., Das, S., Pawar, P. A. M., Kumar, A., Tripathi, K., Kumar, R .R., Yadava, D. K., Kumar, S., & Dikshit, H. K. (2022). Comparative transcriptome analysis, unfolding the pathways regulating the seed-size trait in cultivated lentil (Lens culinaris Medik.). Frontiers in Genetics, 13, 942079. Doi: 10.3389/fgene.2022.942079

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

Fernandes, L. M. P., Bezerra, F. R., Monteiro, M. C., Silva, M. L., de Oliveira, F. R., Lima, R. R., Fontes-Júnior, E. A., & Maia, C. S. F. (2017). Thiamine deficiency, oxidative metabolic pathways and ethanol-induced neurotoxicity: how poor nutrition contributes to the alcoholic syndrome, as Marchiafava–Bignami disease. European Journal of Clinical Nutrition, 71(5), 580-586. Doi: 10.1038/ejcn.2016.267

Gostimsky, S. A., Kokaeva, Z. G., & Konovalov, F. A. (2005). Studying plant genome variation using molecular markers. Genetika, 41(4), 480-492. Doi: 10.1007%2Fs11177-005-0101-1

Grandi, E., Crotti, M., Sigmund, M. C., Xu, G ,.Tepper, P. G., & Poelarends, G. J. (2023). Biocatalytic Cascade Synthesis of Enantioenriched Epoxides and Triols from Biomass-Derived Synthons Driven by Specifically Designed Enzymes. Chemistry–A European Journal, 29(31), e202300697. Doi: 10.1002/chem.20230069

Guo, A. Y., Chen ,X., Gao, G., Zhang, H., Zhu, Q. H., Liu, X. C., Zhong, Y. F., Gu, X., He, K., & Luo, J. (2007). PlantTFDB: a comprehensive plant transcription factor database. Nucleic Acids Research, 36(1), D966-D969. Doi: 10.1093/nar/gkm841

Gupta, D. S., Cheng, P., Sablok, G., Thavarajah, P., Coyne, C. J., Kumar, S., Baum, M., & McGee, R. J. (2016). Development of a panel of unigene-derived polymorphic EST–SSR markers in lentil using public database information. The Crop Journal, 4(5), 425-433. Doi: 10.1016/j.cj.2016.06.012

Hasan, N., Choudhary, S., Naaz, N., Sharma, N., & Laskar, R. A. (2021). Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19(1), 128. Doi: 10.1186/s43141-021-00231-1

Javani, R., & Asadi-Gharneh, H. A. (2020). Mineral composition in populations of Iranian wild celery. International Journal of Vegetable Science, 26(1), 55-61. Doi: 10.1080/19315260.2019.1604603

Kaur, S., Cogan, N. O., Pembleton, L. W., Shinozuka, M., Savin, K. W., Materne, M., & Forster, J. W. (2011). Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. BMC Genomics, 12, 1-11. Doi: 10.1186/1471-2164-12-265.

Khadijeh, A., Heshmat, O., Majid, A. D., & Hasanali, N. B. (2020). A review on the botanical, phytochemical and pharmacological characteristics of Kelussia odoratissima mozaff. Journal of Medicinal Plants, 18(72), 30-45 (In Persian). Doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.30

Khanavi, M., Ghadami, S., Sadaghiani-Tabrizi, G., & Delnavazi, M. R. (2021). Phytochemical constituents of the fruits of Kelussia odoratissima Mozaff., an aromatic plant endemic to Iran. Journal of Medicinal Plants, 20(79), 1-13. https://dorl.net/dor/20.1001.1.2717204.2021.20.79.1.6

Kuang, X., Du, J. R., Liu, Y. X., Zhang, G. Y., & Peng, H. Y. (2008). Postischemic administration of Z-Ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 88(3), 213-221. Doi: 10.1016/j.pbb.2007.08.006

Li, D., Deng, Z., Qin, B., Liu, X., & Men, Z. (2012). De novo assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (Hevea brasiliensis Muell. Arg.). BMC genomics, 13, 1-14 .Doi: 10.1186/1471-2164-13-192.

Majdi, M., Karimzadeh, G., & Malboobi, M. (2014). Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in Tanacetum parthenium. Biologia plantarum, 58(2), 379-384. Doi: 10.1007/s10535-014-0398-5

Mercati, F., Fontana, I., Gristina, A. S., Martorana, A., El Nagar, M., De Michele, R., Fici, S., & Carimi, F. (2019). Transcriptome analysis and codominant markers development in caper, a drought tolerant orphan crop with medicinal value. Scientific Reports, 9(1), 10411. Doi: 10.1038/s41598-019-46613-x

Mezgebu Legesse, H., & Etsegenet Assefa, B. (2020). Biological Application and Disease of Oxidoreductase Enzymes. In M. Mahmoud Ahmed (Ed.), Oxidoreductase (pp. Ch. 1). IntechOpen. Doi: 10.5772/intechopen.93328

Mirzaei, F., Norouzi, R., Siyadatpanah, A., Mitsuwan, W., Nilforoushzadeh, M., Maleksabet, A., Hosseini, M., de Lourdes Pereira, M., Nissapatorn, V., & Hejazi, S. H. (2020). Butanol Fraction of Kelussia odoratissima Mozaff Inhibits the Growth of Leishmania major Promastigote and Amastigote. World's Veterinary Journal, 10(2), 254-259. Doi: 10.36380/scil.2020.wvj33

Niksiar, P., Navvabpour, S., Sabouri, H., Soltanlu, H. & Rahimi, M. (2018). Haplotype Diversity For QTL Associated with Drought tolerance on Chromosome 2 of Rice. Genetic Engineering and Biosafety Journal 7(2): 217-230 (In Persian). http://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1397.7.2.12.3

Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y., Pattanaik, S., & Yuan, L. (2013). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1829(11), 12361247. Doi: 10.1016/j.bbagrm.2013.09.006

Paul, P. E. V., Sangeetha, V., & Deepika, R. G. (2019). Chapter 9 - Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. In V. Buddolla (Ed.), Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry (pp. 107-125). Academic Press. Doi: 10.1016/B978-0-12-816328-3.00009-X

Peng, J., Shi, C., Wang, D., Li, S., Zhao, X., Duan, A., Cai, N., & He, C. (2021). Genetic diversity and population structure of the medicinal plant Docynia delavayi (Franch.) Schneid revealed by transcriptome-based SSR markers. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 21, 100294. Doi: 10.1016/j.jarmap.2021.100294

Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, 1(7), 215-222. Doi: 10.1016/1360-1385(96)86898-1

Ren, Q., Liu, X. Q., Zhou ,X. W., Zhou, X., Fang, G., Wang, B., Wang, Y. P., Peng, D. H., & Li, X. T. (2021). Effects of Huatan Jiangzhuo decoction on diet-induced hyperlipidemia and gene expressions in rats. Chinese Journal of Natural Medicines, 19(2), 100-111. Doi: 10.1016/S1875-5364(21)60011-0

Saina, J. K., Li, Z. Z., Mekbib, Y., Gichira, A. W., & Liao, Y. Y. (2021). Transcriptome sequencing and microsatellite marker discovery in Ailanthus altissima (Mill.) Swingle (Simaroubaceae). Molecular Biology Reports, 48(3), 2007-2023. Doi: 10.1007/s11033-020-05402-w

Samandari-Bahraseman, M. R., Ismaili, A., Esmaeili-Mahan, S., Ebrahimie, E., & Loit, E. (2022). Investigation of Persian black cumin (Bunium persicum Boiss.) transcriptome in the granulation stage and identification of genomic microsatellites in this plant. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

Breeding and Genetic Research, 30(1), 1-15. Doi: 10.22092/ijrfpbgr.2022.356585.1396

Schluttenhofer, C., & Yuan, L. (2017). Challenges towards Revitalizing Hemp: A Multifaceted Crop. Trends in Plant Science, 22(11), 917-929. Doi: 10.1016/j.tplants.2017.08.004

Shen, W., Li, H., Teng, R., Wang, Y., Wang, W., & Zhuang, J. (2019). Genomic and transcriptomic analyses of HD-Zip family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (Camellia sinensis). Genomics, 111(5), 1142-1151. Doi: 10.1016/j.ygeno.2018.07.009.

Smith-Unna, R., Boursnell, C., Patro, R., Hibberd, J. M., & Kelly, S. (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. Genome Research, 26(8), 1134-1144. Doi: 10.1101/gr.196469.115

Sohrabi, S. S., Ismaili, A., Azarian Firouz-Abadi, F. N., & Fallahi, H. (2018). Discovery of EST-SSRs markers in lentil (*Lens culinaris*) under cold stress. Crop Biotechnology, 8(22), 1-14 (In Persian). https://dorl.net/dor/20.1001.1.22520783.1397.8.22.1.5

Song, Z. H., Ji, Z. N., Lo, C. K., Dong, T. T., Zhao, K. J., Li, O. T., Haines, C. J., Kung, S. D., & Tsim, K. W. (2004). Chemical and biological assessment of a traditional chinese herbal decoction prepared from Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis: orthogonal array design to optimize the extraction of chemical constituents. Planta Med, 70(12), 1222-1227. Doi: 10.1055/s-2004-835855

Sudheesh, S., Verma, P., Forster, J .W., Cogan, N. O., & Kaur, S. (2016). Generation and characterisation of a reference transcriptome for lentil (Lens culinaris Medik.). International Journal of Molecular Sciences, 17(11), 1887. Doi: 10.3390/ijms17111887

Taheri, S., Abdullah, T. L., Rafii, M. Y., Harikrishna, J .A., Werbrouck, S. P. O., Teo, C. H., 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), 3047. Doi: 10.1038/s41598-019-39944-2

Tanksley, S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. Plant Molecular Biology Reporter, 1(1), 3-8. Doi: 10.1007/BF02680255

Torki, A., Hosseinabadi, T., Fasihzadeh, S., Sadeghimanesh, A., Wibowo, J. P., & Lorigooini, Z. (2018). Solubility of calcium oxalate and calcium phosphate crystallization in the presence of crude extract and fractions from Kelussia odoratissima Mozaff. Pharmacognosy Research, 10(4), 379-384. Doi: 10.4103/pr.pr_68_18

Wang, P., Yang, L., Zhang, E., Qin, Z., Wang, H., Liao, Y., Wang, X., & Gao, L. (2017). Characterization and development of EST-SSR markers from a cold-stressed transcriptome of centipedegrass by illumina paired-end sequencing. Plant Molecular Biology Reporter, 35, 215-223. Doi: 10.1007/s11105-016-017-8

Wang, X., Chen, S., Ma, X., Yssel, A. E. J., Chaluvadi, S. R., Johnson, M. S., Gangashetty, P., Hamidou, F., Sanogo, M. D., Zwaenepoel, A., Wallace, J., Van De Peer, Y., Bennetzen, J. L., & Van Deynze, A. (2021). Genome sequence and genetic diversity analysis of an under-domesticated orphan crop, white fonio (Digitaria exilis). GigaScience, 10(3), 1-12. Doi: 10.1093/gigascience/giab013

Wang, Z., Li, J., Luo, Z., Huang, L., Chen, X., Fang, B., Li, Y., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Characterization and development of EST-derived SSR markers in cultivated sweetpotato (Ipomoea batatas). BMC plant Biology, 11(1), 1-9. Doi: 10.1186/1471-2229-11-139

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(1), 1-13. Doi: 10.1186/1471-2164-12-451

Wu, Q., Bai, X., Zhao, W., Shi, X., Xiang, D., Wan, Y., Wu, X., Sun, Y., Zhao, J., & Peng, L. (2019). Investigation into the underlying regulatory mechanisms shaping inflorescence architecture in Chenopodium quinoa. BMC Genomics, 20(1), 658. Doi: 10.1186/s12864-019-6027-0

Xu, L., Li, P., Su, J., Wang, D., Kuang, Y., Ye, Z., & Chen, M. (2023). EST-SSR development and genetic diversity in the medicinal plant Pseudostellaria heterophylla (Miq.) Pax. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 33, 100450. Doi: 10.1016/j.jarmap.2022.100450

Yang, C. Q., Fang, X., Wu, X. M., Mao, Y. B., Wang, L. J & ,.Chen, X. Y. (2012). Transcriptional Regulation of Plant Secondary Metabolism. Journal of Integrative Plant Biology, 54(10), 703-712. Doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01161.x

Yin, J., Ren, W., Huang, X., Deng, J., Li, T., & Yin, Y. (2018). Potential mechanisms connecting purine metabolism and cancer therapy. Frontiers in Immunology, 9, 1697. Doi: 10.3389/fimmu.2018.01697

Zhang, J., Liang, S., Duan, J., Wang, J., Chen, S., Cheng, Z., Zhang, Q., Liang, X., & Li, Y. (2012). De novo assembly and characterisation of the transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in peanut (Arachis hypogaea L.). BMC Genomics, 13, 1-6. Doi: 10.1186/1471-2164-13-90

Zhang, X., Luo, H., Xu, Z., Zhu, Y., Ji, A., Song, J., & Chen, S. (2015). Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in Salvia miltiorrhiza. Scientific Reports, 5(1), 11244. Doi: 10.1038/srep11244

Zheng, H., Yu, M. Y., Han, Y., Tai, B., Ni, S. F., Ji, R. F., Pu, C. J., Chen, K., Li, F. Q., Xiao, H., Shen, Y., Zhou, X. T & Huang, L. Q. (2022). Comparative Transcriptomics and Metabolites Analysis of Two Closely Related Euphorbia Species Reveal Environmental Adaptation Mechanism and Active Ingredients Difference. Frontiers in Plant Science, 13, 905275 .Doi: 10.3389/fpls.2022.90527

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, 1-11. Doi: 10.1186/1471-2164-14-490

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]

[Downloaded from mail.gebsj.ir on 2026-09-28]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.226]