



[10.61186/gebsj.12.2.226](https://doi.org/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: 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 نه تنها 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 مواجه 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 ترنسکرپتوم 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 غیر تکراری 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](https://doi.org/10.61186/gebsj.12.2.226)

URL: <http://gebsj.ir/article-1-470-fa.html>

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

این روش 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 روش 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 ترنسکرپتوم است و فرصتی کلیدی برای تحلیل پروفایل بیانی گیاهان را فراهم می‌سازد (Alves-Carvalho et al., 2015). علاوه بر این، با پیشرفت‌های قابل توجه ژنومیکس گیاهی و افزایش حجم اطلاعات موجود، بررسی و شناسایی ژن‌های دخیل در بیوستز متابولیت‌های ثانویه و همچنین شبکه‌های تنظیمی آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است و با سرعت بالایی در حال انجام است (Zheng et al., 2022).

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 هم‌باز 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 مبتنی بر برچسب‌های توالی‌های بیان شونده (Expressed Sequence Tags-SSR: EST-SSR)، رونق بیشتری دارند، زیرا 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 کدکننده تطابق دارند، توالی‌های کناری که نشانگرهای مبتنی بر آن‌ها هستند، در مناطق حفاظت‌شده بین گونه‌های مختلف گیاهی شناخته می‌شوند. از

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 مواجه 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

کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff)، گیاهی چندساله، دیپلوئید ($2n = 2x = 22$) 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). علاوه بر این، در پژوهش‌های مختلف برای این گیاه دارویی اثرات ضد درد، ضدالتهاب و اضطراب، ضد دیابت، ضد سرطان، 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., 2018; Torki et al., 2020). 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.,

تعیین شد و همچنین حداکثر فاصله بین دو مکان نشانگر روی یک توالی ۱۰۰ جفت باز 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: به منظور مستندسازی و تفسیر کارکردی توالی‌های حاوی نشانگر EST-SSR از ابزار OmicsBox استفاده شد. همچنین به منظور 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 ۲۴۲۵۶۰۰۶۸ خوانش تمیز (Clean reads) از مجموع ۲۹۸۹۸۳۸۹۲ خوانش خام شد (جدول ۱). طی فرآیند پیرایش، ۱۸/۸۷ درصد از خوانش‌های کوتاه از مجموع ۶ 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.

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). به منظور مستندسازی پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده گیاه کرفس کوهی از ابزار BLASTX نرم‌افزار (v2.6.0) NCBI 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 $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ مورد هم‌ترازی 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 به ترتیب ۱۰، ۶، ۵، ۵، ۵ و ۵

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	6,914,936,791	47.34
	R2	47730332	35190166	12540166	26.27	6,860,565,483	48.96
	R3	52985612	47432806	5552806	10.48	7,616,307,128	48.96
Two-Year-Old	R1	48793542	36087796	12705746	26.04	6,964,940,326	47.4
	R2	53791644	46952496	6839148	12.71	7,674,289,433	45.08
	R3	48015640	38261542	9754098	20.31	6,850,167,323	45.97

جدول ۲- سنجش کمیت و کیفیت مراجع ترنسکرپتومی 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

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 ریزماهوره: 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 ترنسکرپتوم 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).

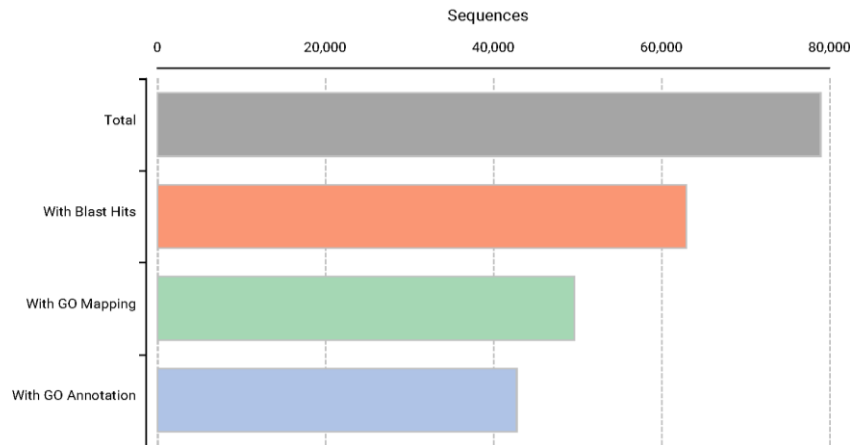
موتیف‌های تک نوکلئوتیدی (مونو) با فراوانی ۲۶۲۷ (۳۴/۶۸ درصد) جایگاه دوم را در بین نشانگرهای شناسایی شده به خود اختصاص داد (جدول ۳). در پژوهشی که به‌منظور شناسایی نشانگرهای SSR بر روی گیاه *Herba houttuyniae* قهوه و چای صورت گرفت، موتیف‌های "مونو" بیشترین میزان فراوانی را به

سرهم‌بندی نوپدید: به‌منظور دستیابی به بهترین مرجع ترنسکرپتومی کرفس کوهی در این پژوهش از رهیافت سرهم‌بندی با k-mer چندگانه استفاده شد. پس از تولید فایل‌های حاصل از سرهم‌بندی ترنسکرپتوم کرفس کوهی با k-merهای ۲۵ تا ۱۱۵، به‌منظور سنجش کمیت و کیفیت و انتخاب بهترین مرجع ترنسکرپتومی 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 ترنسکرپتومی 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 ترنسکرپتوم گیاهان دیپلوئید (۵۰ - ۸۰ Mb) 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 $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ ، 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

وجود خطاهای دستگاه‌های توالی‌یابی چشم‌پوشی می‌شود. ترنسکرپتوم کرفس کوهی شامل توالی‌های تکراری است که نشانگرهای مبتنی بر 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).

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 به دست آمده از ترنسکرپتوم کلزا بیشترین میزان فراوانی را نشان داد (Chen *et al.*, 2017). در برخی از مطالعات که شناسایی نشانگرها در مقیاس وسیع و مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید صورت می‌گیرد از ذکر فراوانی موتیف‌های "مونو" به علت



شکل ۱- نتایج BLASTX ترنسکرپتوم کرفس کوهی علیه پایگاه داده NR و نقشه‌یابی 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 ترنسکرپتوم کرفس کوهی. پایگاه پروتئینی هویج (*Daucus carota*) بیشترین شباهت را با ترنسکرپتوم 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.

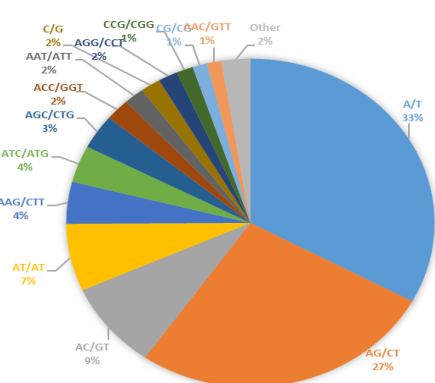
جدول ۳- توزیع موتیف/ تکرارهای نشانگر SSR در ترانسکریپتوم کرفس کوهی

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" ۴۳/۲۶ 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 ترانسکریپتوم عدس دارد (Gupta et al., 2016). در اغلب مطالعاتی که در آنها فراوانی موتیف‌های ۲ تا ۶ 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 ۹۴ جفت‌باز بیشترین میزان فراوانی را در بین موتیف‌های ۲ نوکلئوتیدی ترانسکریپتوم *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

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 این رو 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 ۱۶، ۲۶ و ۶۱ 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، ACCATC/GATGGT و ACCCC/GGGGT به‌ترتیب در گروه موتیف‌های چهار، پنج و شش نوکلئوتیدی بیشترین فراوانی را نشان دادند.

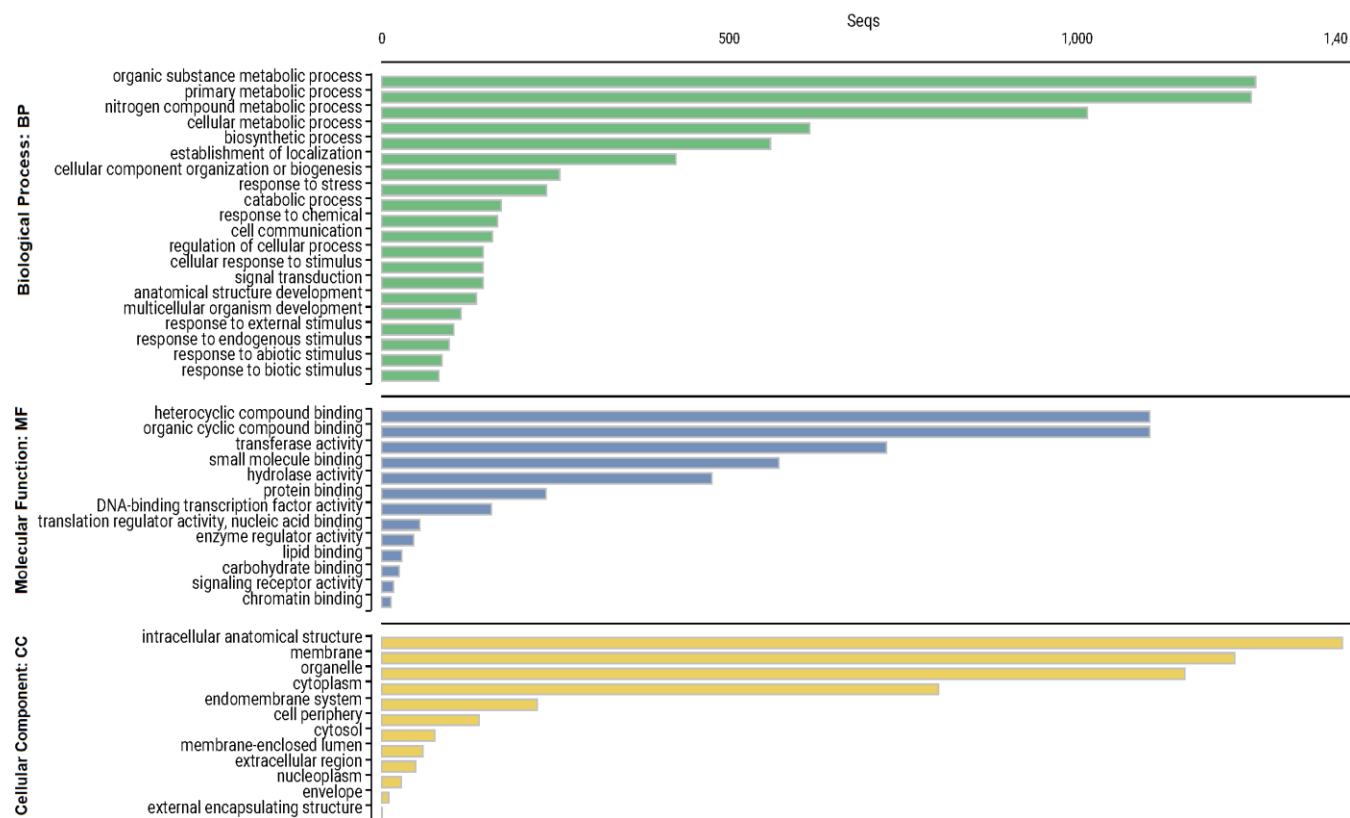


شکل ۳- توزیع موتیف/ تکرارهای ریزماهواره شناسایی شده در ترانسکریپتوم کرفس کوهی

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

و حلقوی آلی و فعالیت ترانسفرازی طبقه‌بندی شدند. (شکل ۴). 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 تأیید 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).

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 فرایندهای بیولوژیکی شامل فرآیندهای متابولیکی، فرآیند بیوسنتزی و متمرکزسازی (Localization) بودند. در بخش عملکرد مولکولی، اتصال ترکیبات هتروسیکلیک



شکل ۴- تحلیل هستی‌شناسی نشانگرهای EST-SSR شناسایی شده در ترانسکرپتوم کرفس کوهی. گروه‌های کارکردی شامل فرآیندهای زیستی (BP)، عملکرد مولکولی (MF) و اجزای سلولی (CC) می‌باشد.

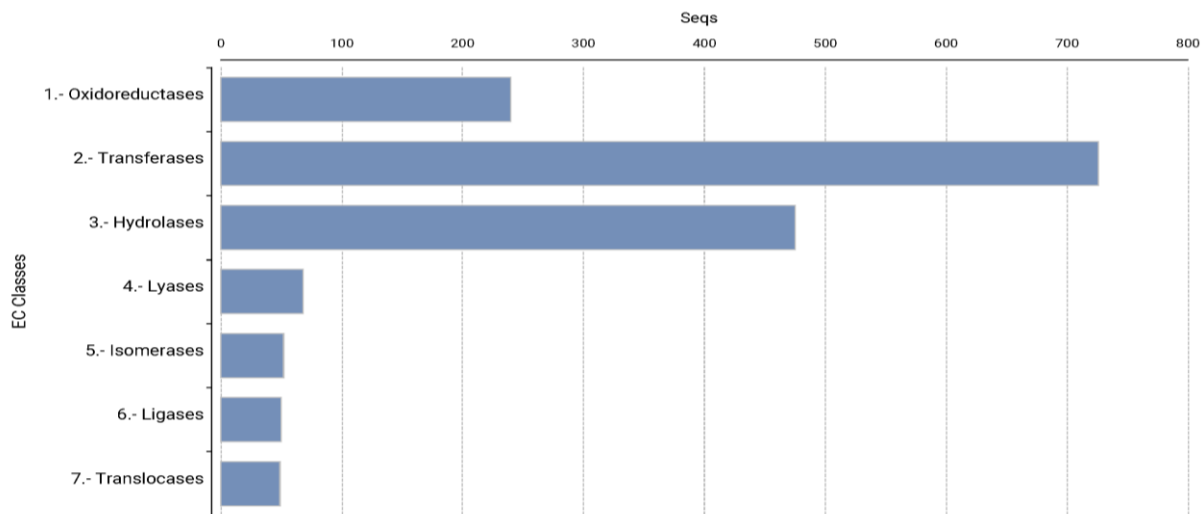
Fig 4. Gene ontology analysis of identified EST-SSRs markers in *Kelussia* transcriptome. Functional groupings encompass three main categories: biological processes (BP), Molecular function (MF), and cellular components (CC).

حاوی توالی‌های EST-SSR، انواع مختلفی از آنزیم‌ها را کد کرده که بر اساس میزان فراوانی شامل آنزیم‌های ترانسفرز، هیدرولاز،

توزیع فراوانی آنزیم‌ها: با توجه به تجزیه و تحلیل‌های صورت گرفته با استفاده از نرم‌افزار OmicsBox مشخص شد که نواحی

هستند. این آنزیم ها هیدرولیز و تشکیل استر و آمید را کاتالیز می کنند. پیوندها لپازها می توانند تری گلیسیرید را به اسیدهای چرب و گلیسرول هیدرولیز کنند. هیدرولازها به طور گسترده برای تولید الکل های فعال نوری، اسیدها، استرها و لاکتون ها با تفکیک جنبشی استفاده شده اند (Paul *et al.*, 2019). آنزیم های اکسید ردوکتاز واکنش هایی شامل وارد کردن اکسیژن، انتقال هیدرید، استخراج پروتون و سایر مراحل ضروری را کاتالیز می کنند. تعدادی از مسیرهای متابولیک مانند گلیکولیز، چرخه کربس، زنجیره انتقال الکترون و فسفوریلاسیون اکسیداتیو، تبدیل دارو و سم زدایی در کبد، فتوسنتز در کلروپلاست نیاز به دخالت مستقیم آنزیم های اکسیدوردوکتاز دارد. علاوه بر این، تخریب مولکول های زیستی غیرضروری توسط اکسیدوردوکتاز کاتالیز می شود (Mezgebu Legesse & Etsegenet Assefa, 2020). به طور کلی می توان گفت که آنزیم های مذکور در تولید متابولیت های ثانویه، شرکت در مسیرهای اصلی بیوسنتزی و ایجاد مقاومت در برابر تنش های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Czerniawski & Bednarek, 2018).

اکسیدردوکتاز و لپاز هستند (شکل ۵). ترانسفرازها انتقال گروه های عاملی مانند متیل، هیدروکسی متیل، فرمال، گلیکوزیل، آسیل، آلکیل، فسفات و گروه های سولفات را با استفاده از یک واکنش جانشین نوکلئوفیل کاتالیز می کنند (Dixon *et al.*, 2010). در واقع ترانسفرازها، بیوکاتالیست هایی هستند که بیشتر در سنتز ترکیبات آلی کاربرد دارند و با افزودن مولکول های آب به یک بستر با استفاده از یک واکنش جایگزینی نوکلئوفیل فرایند را کاتالیز می کنند. هیدرولازها برای تولید واسطه های دارویی و آفت کش ها و سینتون های کایرال برای سنتز نامتقارن استفاده شده اند. 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 به عنوان ترکیبات سنتتیک برای سنتز مولکول های پیچیده تر و بیشتر استفاده می شوند. به دلیل ویژگی چیرگی، این ترکیبات در سنتز مولکول های آلی پیچیده و مواد دارویی با ساختار کایرال بسیار مهم هستند (Grandi *et al.*, 2023). در میان هیدرولازها، آمیدازها، پروتئازها، استرازها و لپازها از اهمیت خاصی برخوردار



شکل ۵- توزیع فراوانی توالی های حاوی EST-SSR کدکننده انواع مختلف آنزیم

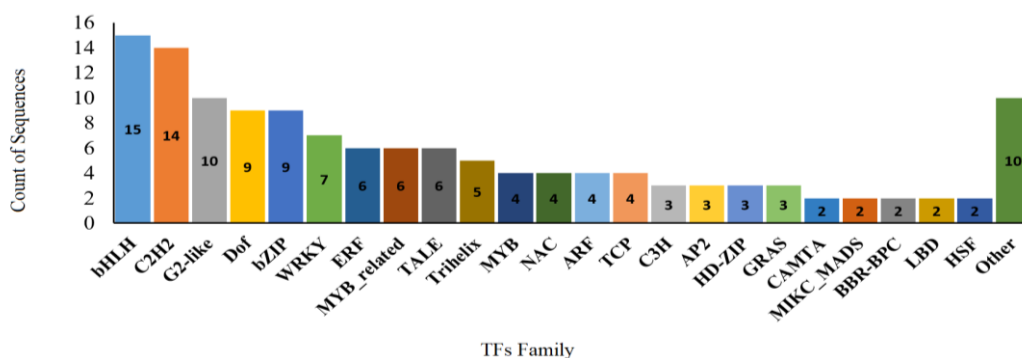
Fig 5. Frequency distribution of EST-SSR-containing sequences encoding different types of enzymes

انواع مختلفی از متابولیت های ثانویه را تنظیم می کنند (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 خانواده های ژنی عوامل رونویسی مربوط

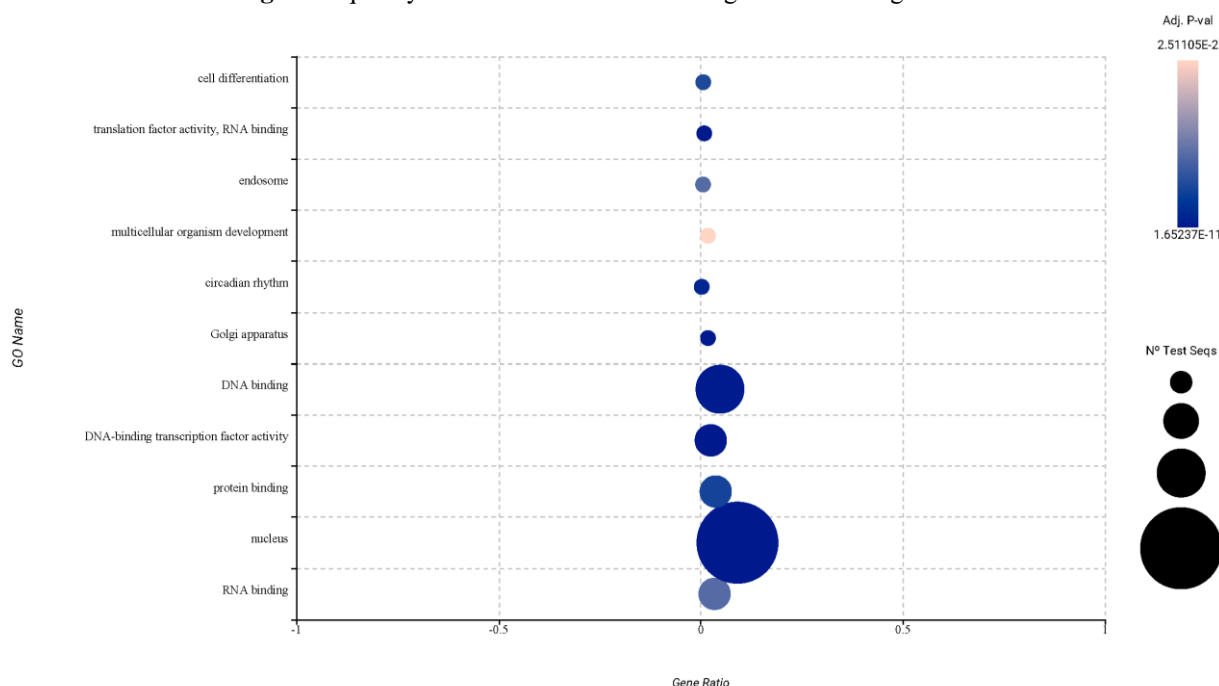
فراوانی عوامل رونویسی: از مهم ترین عوامل کنترل بیان، تنظیم میزان نسخه برداری از ژن ها است که عوامل رونویسی در آنها نقش مهمی دارند (Guo *et al.*, 2007). عوامل رونویسی بیان ژن را در فرآیندهای مختلف زیستی مانند رشد، نمو و سوخت و ساز

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، MYB، bHLH، WRKY، HD-ZIP و bZIP (Yang et al., 2012) و DOF، NAC (Shen et al., 2019; Wu et al., 2019) تنظیم‌کننده‌های بیوستز متابولیت‌های ثانویه گزارش شده‌اند.

به خانواده‌های bHLH، C2H2، G2-Like، Dof، WRKY، bZIP، ERF، MYB-related، TALE، Trihelix است (شکل ۶). 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).



شکل ۶- 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 ترنسکرپتوم کرفس کوهی. نقاط صورتی نشان دهنده مقدار P-Value کوچکتر است. اندازه گره با تعداد ژن مطابقت دارد و نقاط بزرگتر تعداد بیشتری از ژن‌ها 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

جدول ۴- مسیرهای متابولیکی دارای توالی‌های حاوی EST-SSR در ترنسکرپتوم کرفس کوهی

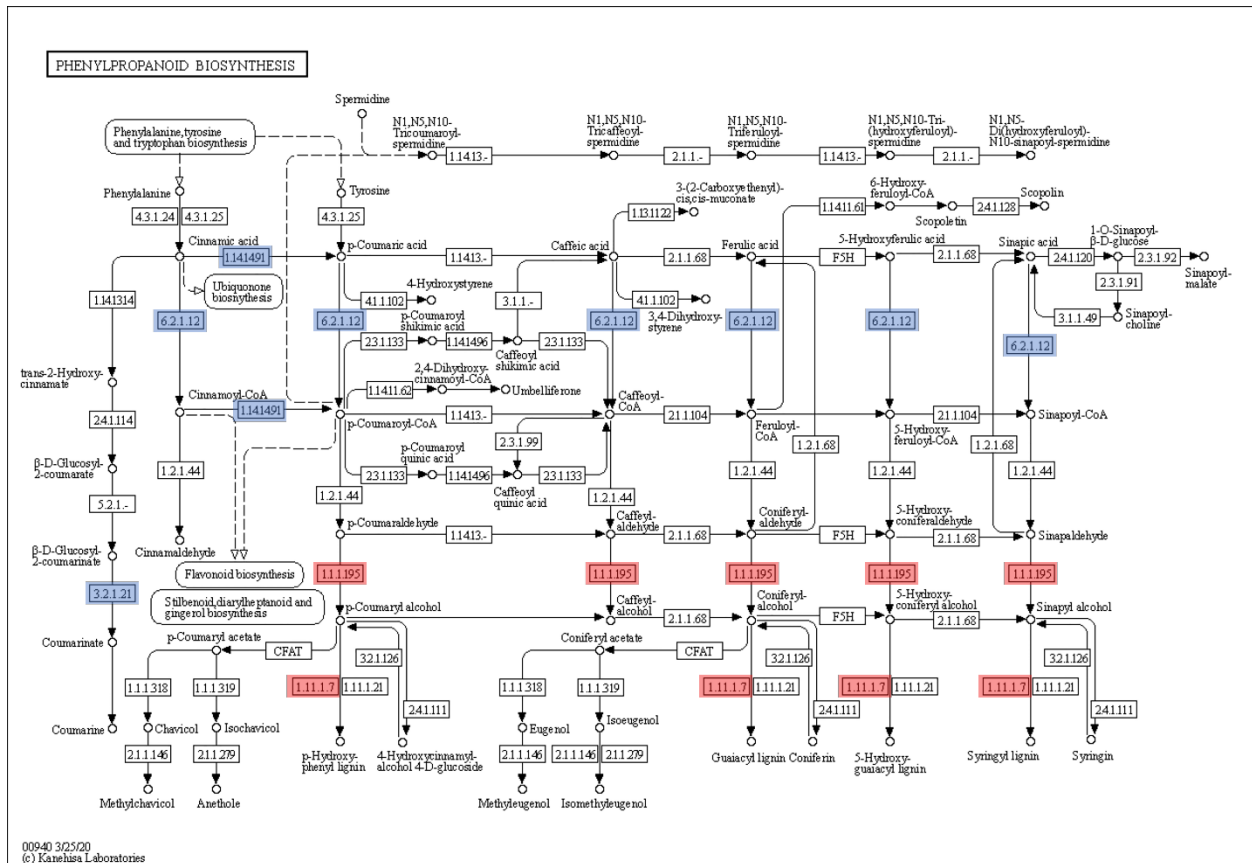
Tab 4. Metabolic pathways with EST-SSR-containing sequences in the Keluss transcriptome

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
Porphyryn 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

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 ۴) که در این بین، گروه‌های سوخت و ساز، گلیکولیز و گلوکونوژنز (Gluconeogenesis)، تبدیل پنتوز و گلوکورونات، تثبیت کربن، مسیر پنتوز فسفات دیده می‌شوند.

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 زیان دسته‌بندی غنی‌سازی کارکردی مشابهی مشاهده شد



شکل ۸- نقشه یابی و بررسی بیان توالی های حاوی EST-SSR دخیل در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید. رنگ قرمز و آبی به ترتیب افزایش و کاهش بیان آنزیم مشخص شده در مقایسه گیاه یکساله نسبت به گیاه دوساله را نشان می دهد.

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

مسیر فنیل پروپانویید: به منظور شناسایی مسیرهای با بیان متفاوت بین گیاهان یکساله و دوساله اطلاعات توالی های رونوشت های با بیان متفاوت به دست آمده، در پایگاه داده KEGG بارگذاری شد. نتایج حاصل از این بررسی، تفاوت در بیان ژن های مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویید به دست آمد. در این بررسی بیان ژن های ترانس سینامات ۴-مونوکسیژناز، ترانس سینامات و بتاگلوکوزیداز در مقایسه گیاه یکساله نسبت به گیاه دوساله افزایش بیان و ژن های ۴- کوماریل الکل و هیدروژ پراکسید اکسیدوردوکتاز کاهش بیان نشان داد (شکل ۸). این آنزیم ها به صورت کلیدی در مسیرهای بیوشیمیایی ترکیبات فلاونوئیدی درگیر بوده و در بحث زیست تبدیلی ترکیبات فنیل پروپانوییدی حائز اهمیت هستند (Ashengroph & Nahvi, 2014). در پژوهشی مشابه بیان ژن های مسیر فنیل پروپانویید در بافت های مختلف، افزایش بیان در گل نسبت به برگ مشاهده شد (Majdi *et al.*, 2014). همچنین در

بیشتر رونوشت ها به مسیرهای متابولیکی و پس از آن مسیر بیوسنتز متابولیت های 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 حفاظت شده استفاده می کند (Yin *et al.*, 2018). مسیر متابولیکی تیمین نیز که مقادیر بالایی از رونوشت های توالی یابی شده را شامل شده، نقش محوری در مسیر پنتوز فسفات دارد که نه تنها یک مسیر سوخت و ساز گلوکز جایگزین است، بلکه یک مسیر اصلی برای سنتز چندین انتقال دهنده، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها، اسیدهای آمینه، استروئیدها و گلوکوتایون است (Fernandes *et al.*, 2017).

نتایج بلاست رونوشت‌های حاوی ریزماهواره نشان داد که ۷۹/۷۴ درصد از رونوشت‌ها دارای حداقل یک رکورد در پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری بودند. علاوه بر 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.

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 ۶۳۸۸ یونی‌ژن در ترنسکرپتوم کرفس کوهی بود. در میان این نشانگرها، موتیف‌های دو نوکلئوتیدی و پس از آن تک و سه نوکلئوتیدی بالاترین فراوانی را نشان دادند.

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., Omid, 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., Omid, H., Amini Dehaghi, M., & Soltani, E. (2021). Evaluation of dormancy breaking treatments on seed germination and soluble compounds of *Kelussia odoratissima* 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://doi.org/10.1001.1.20088264.1393.6.19.10.1>
- 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://doi.org/10.1001.1.23832738.1393.27.3.1.3>
- 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

- 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.202300697
- 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., Mitsuwani, 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.bbagr.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*

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

