

توالیابی بخشی از ژن فنیل آلانین آمونیا لایاز (pal_2) دخیل در مسیر سنتز آنتی اکسیدان ها و استفاده از آن در فیلوژنی جنس های مهم زیر خانواده *Anthemideae*

Sequencing part of phenylalanin ammonia lyase (pal_2) gene involved in antioxidant synthesis pathway to use in phylogeny of important genera belong to *Anthemideae* subfamily

احمد یامچی^{۱*}، منیره صادقی دستجردی^۲، مهدی رحیم ملک^۲، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی^۲

۱- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیار، استاد، دانشگاه صنعتی اصفهان

Yamchi A^{*1}, Sadeghi Dastjerdi M², Rahimmalek M², Sayed Tabatabaee BE²

1. Assistant professor, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Graduated MSc Student, Assistant professor, Professors, Isfahan University of Technology, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: yamchi@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

بومادران، درمنه، بابونه، داوودی و مخلصه از جمله مهم ترین جنس هایی زیر خانواده *Anthemideae* هستند که به دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدها و آنتی اکسیدانی کاربردهای قابل توجهی در داروسازی دارند. فلاونوئیدها ترکیبات فنلی هستند که جزو آنتی اکسیدان های غیر آزمی طبقه بندی می شوند. فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL) آنزیم کلیدی در مسیر سنتز فلاونوئیدها می باشد. برای شناسایی و تعیین توالی ژن pal_2 ابتدا براساس همدیف سازی چند تایی توالی های جستجو شده برای گیاه مدل آراییدوپسیس و سایر گیاهان در پایگاه داده های بانک ژن (NCBI)، انجام شد. آغازگرهای اختصاصی به صورت هرز براساس نواحی حفاظت شده در ناحیه ژنی و همچنین ناحیه فعال دومین پروتئین PAL2 طراحی شد. آغازگرها در جنس های مذکور ناحیه ای به طول ۷۰۰ جفت نوکلئوتید را تکثیر و سپس محصول PCR کلون و در ادامه تعیین توالی و در بانک ژن (NCBI) ثبت شدند. به منظور بررسی تنوع ژن pal_2 بر اساس توالی نوکلئوتیدها (جایگزینی های همجنس Transition و ناهمجنس Transversion نوکلئوتیدها) در بین جنس های ذکر شده از نرم افزار Mega ver 5.0 استفاده و درصد تنوع محاسبه شد. نتایج بیوانفورماتیک بررسی تنوع نشان دادند جنس های مذکور از نظر ژن pal_2 به خوبی حفاظت شده می باشند و *Matricaria sp.* و *Achillea sp.* نزدیکترین جنس ها به یکدیگر و جنس های *Artemisia sp.* و *Chrysanthemum sp.* دورترین جنس ها از یکدیگر محسوب می شوند.

واژه های کلیدی

تنوع
ژن pal_2
Anthemideae
DNA

پلی‌فنول‌ها آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاهی هستند. این مواد شامل فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگن‌ها هستند که از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و این واکنش ناشی از فعالیت یک آنزیم کلیدی به نام فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) است که یک نقطه ارتباطی مهم بین متابولیسم‌های اولیه (مسیر شیکیمات) و متابولیسم‌های ثانویه (مسیر فنیل پروپانویدها) در گیاهان محسوب می‌شود (Lewis and Yamamoto 1990; Rice-Evans 2004). آنزیم PAL استخراج شده از گیاهان مختلف دارای یک ساختار تترامر با وزن مولکولی ۲۲۵ تا ۳۳۰ کیلودالتون می‌باشد (Fritz et al. 1976; Veveridis et al. 2007). در گیاه آرابیدوپسیس خانواده ژنی *pal* دارای چهار ایزوفرم می‌باشد. بیان ژن *pal1* در گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia miltiorhiza*) گزارش شده است (Song and wang 2009). *Anthemideae* یکی از زیرخانواده‌های مهم کاسنی است و جنس‌های موجود در این زیرخانواده به علت دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی فراوان منابع مناسبی برای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی محسوب می‌شوند. از جمله مهمترین جنس‌های این زیرخانواده می‌توان به جنس‌های *Matricaria* sp. (بابونه)، *Chrysanthemum* sp. (داوودی)، *Tanacetum* sp. (مخلصه)، *Artemisia* sp. (درمنه)، *Achilleamillefolium* (بومادران) و *Santolina* sp. (سانتولینا) اشاره کرد. تاکنون هیچ یک از اعضای خانواده‌های ژنی *pal* در گیاهان دارویی زیرخانواده *Anthemideae* شناسایی و توالی‌یابی نشده‌اند و هیچ گونه مطالعه‌ای در این زمینه گزارش نشده است. به همین منظور در این پژوهش ردیابی و توالی‌یابی ژن *pal* در جنس‌های مذکور مورد مطالعه قرار گرفت.

تهیه نمونه‌های گیاهی و استخراج DNA

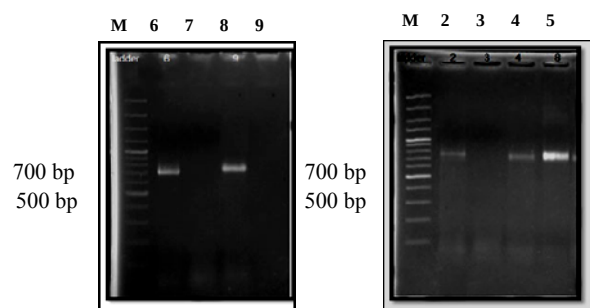
به منظور تهیه نمونه‌های گیاهی، بذر نمونه‌های مذکور از سازمان جنگل و مرتع تهیه و در گلدان‌هایی حاوی خاک مخلوط با ماسه کشت شدند. پس از گذشت دو الی سه ماه از تاریخ کشت از جنس‌های مختلف نمونه‌های برگ‌گی تهیه شده و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA ژنومی با روش Murry and Thompson (1984) تغییر یافته انجام گرفت. پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از ژل آگارز ۰/۷ درصد و اسپکتروفتومتر (IMPLEN) بررسی شد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی و انجام واکنش PCR به منظور طراحی آغازگر برای ژن موردنظر *pal2* ابتدا با مراجعه به پایگاه داده‌های بانک ژن در NCBI (<http://www.NCBI.nlm.nih.gov>) توالی نوکلئوتیدی و توالی آمینواسیدی ژن موردنظر برای گیاه مدل آرابیدوپسیس جستجو شد و سپس با استفاده از ابزار جستجوی BLAST موجود در پایگاه داده‌های NCBI، توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این ژن در سایر گیاهان نیز بدست آمد. هم‌ردیف‌سازی چندتایی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 5.0 به صورت جداگانه برای توالی‌های نوکلئوتیدی و توالی‌های آمینواسیدی صورت گرفت. نواحی حفاظت شده آمینواسیدی (Activ site) برای پروتئین PAL از سایت EXPASY (<http://www.expasy.org>) جستجو شد و پس از مشخص کردن این نواحی بر روی توالی‌های هم‌ردیف شده پروتئینی، ناحیه متناظر با آن روی توالی‌های نوکلئوتیدی نیز شناسایی شد و سپس از این نواحی حفاظت شده آغازگر رفت با استفاده از نرم‌افزار OLIGO ver 5.0 طراحی شد. آغازگر پسر و نیز در فاصله ۷۰۰ جفت بازی از ناحیه طراحی آغازگر رفت و در ناحیه آگزون سوم طراحی شد. آغازگرها به صورت هرز طراحی شدند تا انعطاف‌پذیری برای جنس‌های موردنظر را داشته باشند توالی آغازگر پیشرو و پسر و به ترتیب 5'-GGDGTCCYCTGGAAGTTACCACCRT-3' و 5'-R-*pal2* و 3'-F-*pal2* AHTCMGCMACRMGAGCVGC می‌باشد. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر غلظت، دو میلی‌مولار کلرید منیزیم، یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر و ۲۰ نانوگرم DNA (طبق برنامه $1 \times 72^{\circ}\text{C} / 1' + [94^{\circ}\text{C} / 1' + 55^{\circ}\text{C} / 1' + 72^{\circ}\text{C} / 1'] \times 34 + 95^{\circ}\text{C} / 5'$ انجام شد.

همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعات تکثیر شده

به منظور توالی‌یابی قطعات موردنظر، الحاق محصولات حاصله از واکنش PCR به پلاسمید pTZ57R/T تهیه شده از کیت PCR Cloning Kit (Fermentas) InsTAclone™ انجام شد. سپس با استفاده از روش الکتروپوریشن پلاسمیدهای نو ترکیب به داخل باکتری *E. coli* MC1061 منتقل شدند. پس از کشت

سایت Expasy نواحی فعال پروتئینی (Activ site) برای هر کدام از توالی‌های آمینواسیدی به صورت جداگانه جستجو شد. آغازگرهای $F-pal_2$ و $R-pal_2$ در جنس‌های *Matricaria sp.*، *Artemisia sp.*، *Achillea sp.* و *Chrysanthemum sp.* ناحیه‌ای به طول تقریبی ۷۰۰ جفت باز را به خوبی تکثیر کردند (شکل ۱).



شکل ۱) نتایج حاصل از PCR با استفاده از آغازگرهای pal_2 چاهک ۲، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب مرتبط با تکثیر ژن pal_2 در جنس‌های *Matricaria sp.*، *Artemisia sp.*، *Achillea sp.* و *Chrysanthemum sp.* می‌باشد.

توالی‌های به دست آمده از ژن pal_2 در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* به خوبی توانستند با یکدیگر و نیز با توالی ژن‌های همتای خود در سایر گیاهان موجود در پایگاه NCBI هم‌دیف شوند که این امر به خوبی صحت توالی‌های به دست آمده را تایید کرد. علاوه بر این بررسی توالی‌های آمینواسیدی حاصل از ترجمه قطعات به دست آمده در ژن‌های مذکور و هم‌دیف‌سازی مناسب آن‌ها با توالی آمینواسیدی پروتئین‌های PAL2 در سایر گیاهان و دارا بودن ناحیه فعال پروتئینی در این جنس‌ها، تایید دیگری بر صحت نتایج حاصله از BLAST داشت. در نهایت توالی‌های بدست آمده از ژن pal_2 در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* در پایگاه NCBI ثبت شد (جدول ۱). نتایج حاصل از محاسبه میانگین کل Pairwise-distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance و نیز درصد تنوع برای ژن pal_2 بیانگر وجود بیشترین درصد تنوع و فاصله ژنتیکی بین جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* با جنس *Arabis* و وجود بیشترین شباهت بین جنس‌های مورد مطالعه زیرخانواده *Anthemideae* با *A. annua* بودند (جدول ۱).

کلون‌ها روی محیط‌های LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و رشد آن‌ها، به منظور تشخیص و تایید همسانه‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب از سه روش (۱) غربالگری سریع؛ (۲) انجام واکنش Colony PCR و (۳) استخراج پلاسمید از همسانه‌ها و هضم آنزیمی استفاده شد. پس از انجام این مراحل، همسانه‌هایی که حاوی قطعه مورد نظر بودند توالی‌یابی شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در ابتدا با شناسایی توالی مربوط به پلاسمید و هم‌دیف‌سازی آن با توالی‌های به دست آمده، ناحیه مربوط به پلاسمید جداسازی و توالی‌ها خالص‌سازی شدند. سپس با استفاده از ابزار BLAST موجود در پایگاه داده‌های NCBI صحت توالی‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین هم‌دیف‌سازی چندتایی توالی‌ها با یکدیگر و نیز با توالی‌های مربوط به گیاهان دیگر در پایگاه داده‌های NCBI، با استفاده از نرم‌افزارهای Mega ver5.0 و Multalin صورت گرفت. محاسبه درصد تنوع ژن pal_2 با استفاده از نرم‌افزار ARLEQUIN ver 3.1 انجام شد و تعداد جایگزینی‌های همجنس و ناهمجنس محاسبه شد و پس از آن تعداد کل جایگزینی، حذف و اضافه به تعداد کل نوکلئوتیدها تقسیم شده و درصد تنوع برای ژن pal_2 به دست آمد. همچنین میانگین pairwise distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 5.0 به دست آمد. در این مقاله تمام فاصله‌های ژنتیکی محاسبه شده بر اساس میانگین Pairwise distance صورت گرفت و این به دلیل عدم تساوی نمونه‌های موجود بود. هم چنین به منظور بررسی رابطه فیلوژنی جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* از نظر ژن‌های pal_2 ، با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 5.0 تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی داده‌ها با استفاده از ضریب حداکثر صرفه‌جویی صورت گرفت و نمودارهای خوشه‌ای رسم شد. به منظور مقایسه تنوع جنس‌های مهم زیر خانواده *Anthemideae* از نظر ژن pal_2 ، درصد شباهت با استفاده از ابزار جستجوی شباهت‌ها در سایت (<http://www.ebi.ac.uk>) به دست آمد. همچنین برای بررسی توالی‌های آمینواسیدی، توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 5.0 به توالی‌های آمینواسیدی تبدیل شد و سپس با استفاده از ابزار جستجوی ScanProsit در

جدول ۱- بررسی سه پارامتر میانگین کل pairwise distance براساس دو مدل K2P و P-distance و درصد تنوع در ژن *pal2* بین جنس‌های *Achillea millefolium*، *Artemisia sp.*، *Matricaria sp.* و *Chrysanthemum sp.* با یکدیگر، بین جنس‌های مذکور با آرآبیدوپسیس، بین جنس‌های مذکور با *Artemisia annua* و نیز بین جنس‌های مذکور با جنس‌های مختلف از خانواده Asteraceae

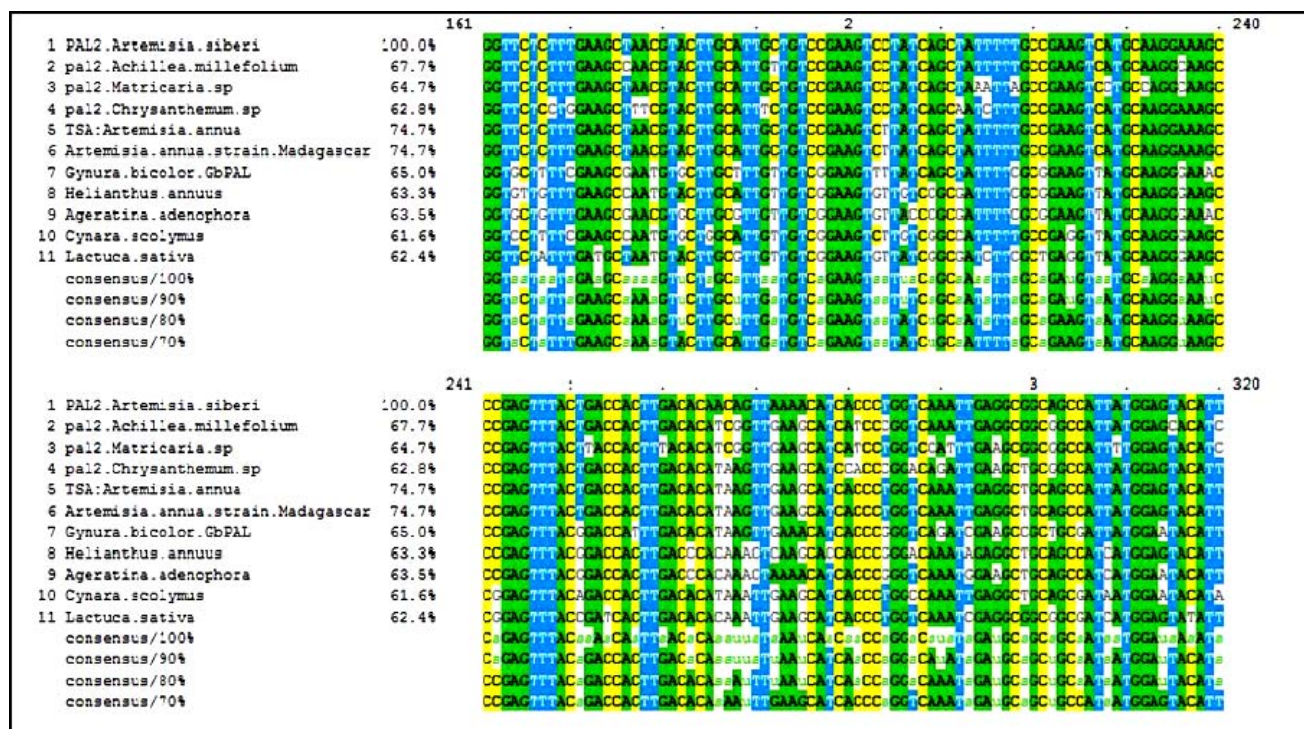
جنس یا گونه گیاهی	شماره ثبت جدید	میانگین کل pairwise distance	میانگین کل pairwise distance	در صد تنوع براساس جایگزینی
در NCBI	بر اساس مدل K2P	بر اساس مدل P-distance	های همجنس و ناهمجنس	
<i>Artemisia siberi</i> <i>Matricaria chamomila</i> <i>Chrysanthemum sp</i> <i>Achillea millefolium</i>	KF585042 KF585044 KF585045 KF585043	۰/۱۷۷	۰/۱۵۶	٪۳۰/۲
With <i>Arabidopsis thaliana</i>	-	۰/۴۳۷	۰/۳۲۸	٪۵۲
With <i>Artemisia annua</i>	-	۰/۱۳۷	۰/۱۲۳	٪۳۲
With <i>Lactuca sativa</i>	-	۰/۲۳۳	۰/۱۹۷	٪۳۵
With <i>Lactuca sativa</i> <i>Ageratina adenophora</i> <i>Gynura bicolor</i> <i>Helianthus annuus</i>	-	۰/۲۴۷	۰/۲۰۶	٪۳۳/۴

Matricaria chamomila نزدیکترین گونه‌های این دو جنس به یکدیگر در زیرخانواده *Anthemideae* می‌باشند به علت اینکه هر دو جنس بر اساس طبقه‌بندی بر مبنای ژن *ndhf* در بخش گیاهی *Matricariinae* قرار دارند (Watson et al. 2000; Himmelreich et al. 2008). اما ژن *pal2* با توجه به اینکه در ژنوم هسته‌ای گیاه قرار گرفته طبیعتاً نسبت به ژن‌های کلروپلاستی بسیار متنوع‌تر می‌باشد و شاید بتوان گفت که رسم نمودار خوشه‌ای بر اساس آن‌ها به همراه ژن‌های کلروپلاستی می‌تواند نتایج تکمیل‌کننده‌ای در مطالعات آتی داشته باشد. بررسی درصد شباهت بین جنس‌های مهم زیرخانواده *Anthemideae* با سایر جنس‌های خانواده - *Asteraceae* صورت گرفت و نتایج به خوبی نشان می‌دهد که با وجود تنوع بیشتر جنس‌های مورد مطالعه از نظر ژن *pal2*، این ژن در طول تکامل بین جنس‌های خانواده *Asteraceae* حفاظت شده- تر بوده است (شکل ۲).

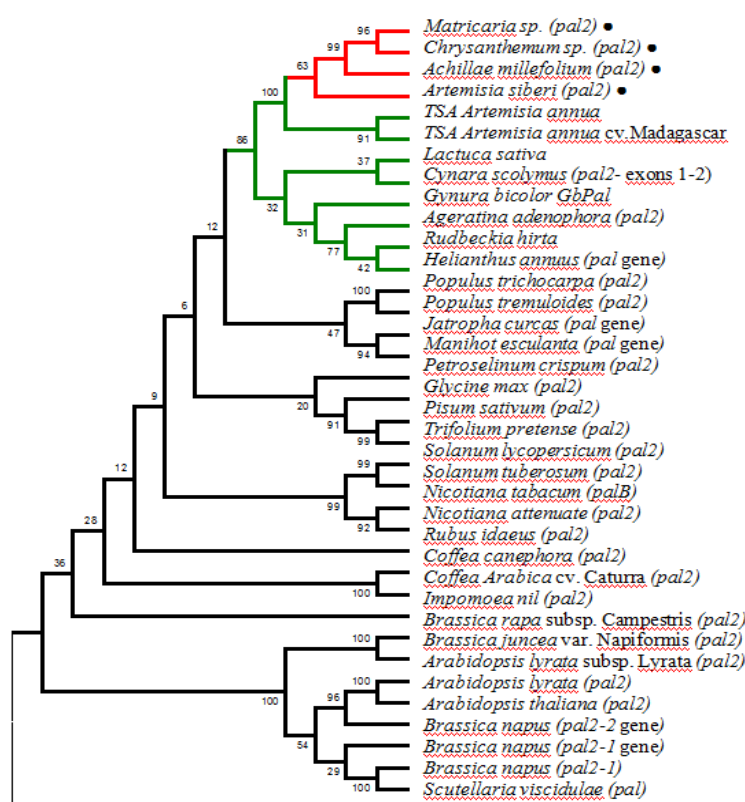
مقایسه درصد تنوع و نیز فاصله ژنتیکی بر اساس دو پارامتر K2P و P-distance نیز به خوبی صحت نتایج به دست آمده بر اساس درصد شباهت را تایید می‌کند. رسم نمودار خوشه‌ای نیز به خوبی نشان داد که جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* از نظر ژن *pal2* به سایر جنس‌های خانواده *Asteraceae* نزدیکتر می‌باشند (شکل ۳).

به منظور توجیه تنوع به دست آمده، میانگین کل Pairwise-distance براساس مدل K2P و P-distance و نیز درصد تنوع براساس جایگزینی‌های همجنس و ناهمجنس برای سایر خانواده‌های گیاهی که توالی ژن‌های *pal2* برای برخی از جنس‌های آنان در پایگاه داده‌های NCBI موجود بود محاسبه شد (داده‌های حاصله در این مقاله نمایش داده نشده است) و نتایج برای هر ژن به صورت جداگانه با نتایج به دست آمده در جنس‌های مورد مطالعه زیرخانواده *Anthemideae* مقایسه شد که داده‌های بدست آمده از سایر خانواده‌های گیاهی با نتایج به دست آمده در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* کاملاً تطابق داشت و به خوبی میزان تنوع به دست آمده در مورد ژن‌های مذکور را در گیاهان زیرخانواده *Anthemideae* توجیه کرد. علت استفاده از میانگین Pairwise-distance عدم تساوی نمونه‌های موجود در سایر خانواده‌های گیاهی بود.

محاسبه میانگین Pairwise-distance نیز برای مقایسه دو به دو جنس‌ها با یکدیگر برای ژن *pal2* صورت گرفت (داده‌ها نمایش داده نشده است)، که نتایج حاصل از محاسبه این پارامتر در ژن *pal2* با نتایج به دست آمده بر اساس نشانگرهای مولکولی ITS و ژن کلروپلاستی *ndhf* همسو بودند (Watson et al. 2000; Himmelreich et al. 2008). به گونه‌ای که در مورد هر دو ژن *pal2* و *ndhf* مشاهده شد که گونه‌های *Achillea millefolium* و



شکل ۲- نتایج حاصل از بررسی درصد شباهت بین جنس‌های زیرخانواده Anthemideae با سایر جنس‌های خانواده Asteraceae در ژن pal_2



شکل ۳- نمودار خوشه‌ای مربوط به روابط ژنتیکی گونه‌های مهم زیر خانواده Anthemideae و جایگاه آنان در ارتباط با گونه‌هایی از سایر جنس‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI بر اساس ژن pal_2 . با استفاده از ضریب Maximum parsimony، جنس‌های مذکور زیرخانواده Anthemideae با علامت • مشخص شده است.

تنش‌های زنده و غیرزنده بررسی شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه به خوبی نشان داد که روش جستجوی شباهت‌ها به خوبی توانست توالی ژن *pal2* را در جنس‌هایی که تاکنون هیچ توالی مشابهی برای آن‌ها در دسترس نبوده، شناسایی کند. در ادامه این تحقیق بررسی بیان این ژن تحت تاثیر هورمون‌های گیاهی در حال انجام است و افزایش بیان این ژن‌ها راه را برای تولید هرچه بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی جهت افزایش کیفیت گیاهان دارویی هموار می‌سازد و در ادامه استخراج مواد موثره را مقرون به صرفه می‌کند.

منابع

- Fritz RR, Hodgins DS, Abell CW (1976) Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 251: 4646-4650.
- Himmelreich S, Kllersj M, Eldens P, Oberprieler C (2008) Phylogeny of southern hemisphere Compositae Anthemideae based on nrDNA ITS and cpDNA *ndhF* sequence information. *Plant Systematics and Evolution* 272: 131-153.
- Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Biology* 41: 455-496.
- Murry M, Thompson WF (1984) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Rice-Evans C (2004) Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 827-828.

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و حضور ترکیبات آنتی اکسیدانی در آن‌ها مطالعات و بررسی‌ها در رابطه با این ژن‌ها رو به افزایش است ولی در زمینه ژن مذکور مطالعات مشابهی در جنس‌های زیر خانواده *Anthemideae* وجود ندارد و بیشتر مطالعات صورت گرفته روی بیان این ژن‌ها در برخی از گیاهان بوده است. از محدود مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است می‌توان به بررسی آنزیم‌های SOD، CAT، APX، GPX در گیاه دارویی جینسینگ (*Panax ginseng*)، اشاره کرد (Yang et al. 2010). در مطالعه مذکور بر اساس توالی‌های بدست آمده در آنزیم‌های مذکور، بیان ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها در شرایط

- Song J, Wang Z (2009). Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia lyase gene (smPAL) from *Salvia miltiorrhiza*. *Molecular Biology Report* 36: 939-952.
- Veveridis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretschmar G, Panopoulos N (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenyl prpanoid- driven natural products. *Biotechnology Journal* 2: 1235-1249.
- Watson LE, Evans TM, Bluarte T (2000) Molecular phylogeny and biogeography of tribe Anthemideae (Asteraceae), based on chloroplast gene *ndhf*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 59-69.
- Yang DC, Sathiyaraj G, Lee OR, Parvin S, Khorolragchaa AJ, Kim Y (2010) Transcript profiling of antioxidant genes during biotic and abiotic stresses. *Molecular Biology Report* 10: 458-4668.