ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۲۹۸-۲۹۳

توالی‌یابی بخشی از ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز (pal_2) دخیل درمسیر سنتز آنتی اکسیدان‌ها و استفاده از آن در فیلوژنی جنس‌های مهم زیرخانواده *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

احد 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 کارشناس‌ارشد، استادیار، استاد، دانشگاه صنعتی اصفهان

Yamchi A*[1], Sadeghi Dastjerdi M[2], Rahimmalek M[2], Sayed Tabatabaee BE[2]

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 مهم‌ترین جنس‌هایی زیرخانواده *Anthemideae* هستند که به دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدانی کاربردهای قابل توجهی در داروسازی دارند. فلاونوئیدها ترکیبات فنلی هستند که جزو آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی طبقه‌بندی می‌شوند. فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) آنزیم کلیدی در مسیر سنتز فلاونوئیدها می‌باشد. برای شناسایی و تعیین توالی ژن *pal2* ابتدا براساس همردیف‌سازی چندتایی توالی‌های جستجو شده برای گیاه مدل آرابیدوپسیس و سایر گیاهان در پایگاه داده‌های 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 جنس‌های مذکور ناحیه‌ای 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 *pal2* بر اساس توالی نوکلئوتیدها (جایگزینی‌های همجنس Transition و ناهمجنس Transversion نوکلئوتیدها) در بین جنس‌های ذکر شده از نرم افزار Mega ver 5.0 استفاده و درصد تنوع محاسبه شد. نتایج بیوانفورماتیک بررسی تنوع نشان دادند جنس‌های مذکور از نظر ژن *pal2* به خوبی حفاظت شده می‌باشند و *Matricaria* sp. و *Achillea* sp. نزدیکترین جنس‌ها به یکدیگر و جنس‌های *Artemisia* sp. و *Chrysanthemum* sp. دورترین جنس‌ها از یکدیگر محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی

تنوع
ژن *pal2*
Anthemideae
DNA

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.15.3]

پلی‌فنول‌ها آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاهی هستند. این مواد شامل فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگنن‌ها هستند که از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و این واکنش ناشی از فعالیت یک آنزیم کلیدی به نام فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) است که یک نقطه ارتباطی مهم بین متابولیسم‌های اولیه (مسیر شیکیمات) و متابولیسم‌های ثانویه (مسیر فنیل پروپانوئیدها) 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 *pal*$_1$ در گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia miltiorhizza*) 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 توالی یابی 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 برگی 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 پسرو نیز در فاصله ۷۰۰ جفت بازی از ناحیه طراحی آغازگر رفت و در ناحیه اگزون سوم طراحی شد. آغازگرها به صورت هرز طراحی شدند تا انعطاف‌پذیری برای جنس‌های موردنظر را داشته باشند توالی آغازگر پیشرو و پسرو به ترتیب *F-pal*$_2$ 5′-AHTCMGCMACRMGAGCVGC -3′ و *R-pal*$_2$ 5′- GGDGTYCCYTGGAAGTTACCACCRT -3′ 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 پلیمراز، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر و ۲۰ نانوگرم DNA) طبق برنامه ۱ x ۹۵°C/۵′ + ۳۴ x [۹۴°C/ ۱′ + ۵۵°C/ ۱′ + ۷۲°C / ۱′] +۱ x ۷۲°C /۱۰′ 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 InsTAclone^{TM} PCR Cloning Kit (Fermentas) انجام شد. سپس با استفاده از روش الکتروپوریشن پلاسمیدهای نوترکیب به داخل باکتری *E. coli* MC1061 منتقل شدند. پس از کشت

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

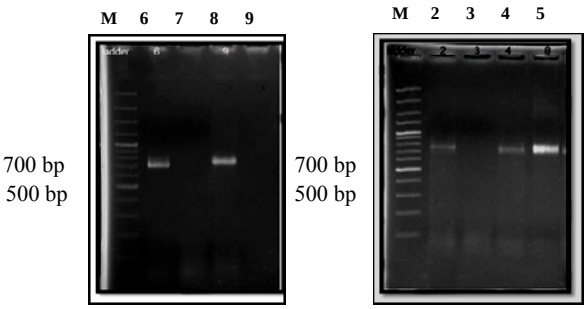
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.15.3]

کلون‌ها روی محیط‌های LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و رشد آن‌ها، به منظور تشخیص و تایید همسانه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب 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 همردیف‌سازی 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 همردیف‌سازی 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 *pal2* با استفاده از نرم-افزار 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 *pal2* 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 *pal2*، با استفاده از نرم-افزار 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 *pal2*، 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 ابزار جستجوی ScanProsit در سایت Expasy نواحی فعال پروتئینی (Activ site) برای هرکدام از توالی‌های آمینواسیدی به صورت جداگانه جستجو شد.

آغازگرهای $F\text{-}pal_2$ و $R\text{-}pal_2$ در جنس‌های *Matricaria* sp.، *Arthemisia* sp.، *Achillea* sp. و *Chrysanthemum* sp. ناحیه‌ای به طول تقریبی ۷۰۰ جفت باز را به خوبی تکثیر کردند (شکل۱).



شکل۱) نتایج حاصل از PCR با استفاده از آغازگرهای *pal2*، چاهک ۲، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب مرتبط با تکثیر ژن *pal2* در جنس‌های *Matricaria sp.*، *Arthemisia sp.*، *Achillea sp.* و *Chrysanthemum sp.* می‌باشد.

توالی‌های به دست آمده از ژن *pal2* در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* به خوبی توانستند با یکدیگر و نیز با توالی ژن‌های همتای خود در سایر گیاهان موجود در پایگاه NCBI همردیف 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 همردیف‌سازی 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 *pal2* در جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* در پایگاه NCBI ثبت شد (جدول۱). نتایج حاصل از محاسبه میانگین کل Pairwise-distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance و نیز درصد تنوع برای ژن *pal2* بیانگر وجود بیشترین درصد تنوع و فاصله ژنتیکی بین جنس‌های زیرخانواده - *Anthemideae* با جنس آرابیدوپسیس و وجود بیشترین شباهت بین جنس‌های مورد مطالعه زیرخانواده *Anthemideae* با *A. annua* بودند (جدول ۱).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.15.3]

جدول۱- بررسی سه پارامتر میانگین کل pairwise distance براساس دو مدل K2P و P-distance و درصد تنوع در ژن *pal2* بین جنس‌های *Achilleamillefolium*، *Artemisia* sp.، *Matricaria* sp. و *Chrysanthemum* sp. با یکدیگر، بین جنس‌های مذکور با آرابیدوپسیس، بین جنس‌های مذکور با *Artemisi aannua* و نیز بین جنس‌های مذکور با جنس‌های مختلف از خانواده Asteraceae

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

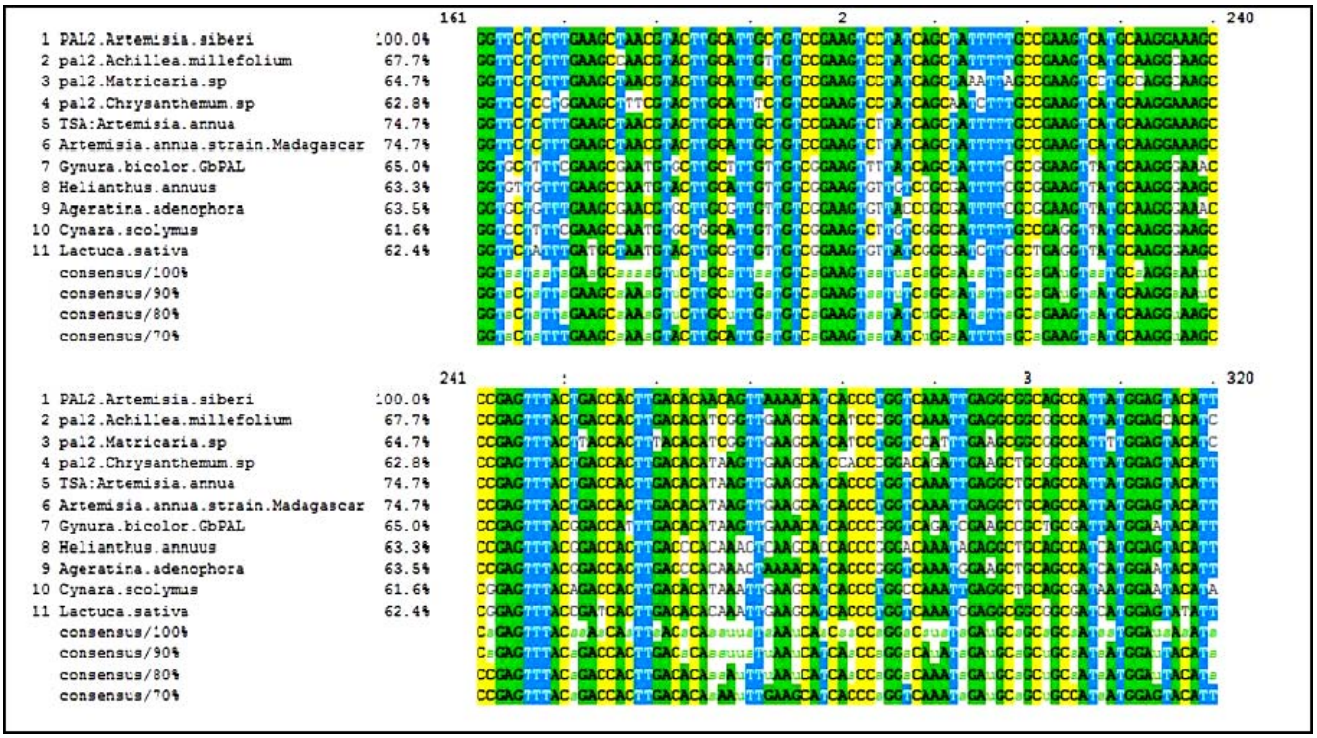
به منظور توجیه تنوع به دست آمده، میانگین کل Pairwise-distance براساس مدل K2P و P-distance و نیز درصد تنوع براساس جایگزینی‌های همجنس و ناهمجنس برای سایر خانواده های گیاهی که توالی ژن‌های pal_2 برای برخی از جنس‌های آنان در پایگاه داده‌های NCBI موجود بود محاسبه شد (داده‌های حاصله در این مقاله نمایش داده 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 جنس-های زیرخانواده *Anthemideae* کاملا 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-distanc نیز برای مقایسه دو به دو جنس‌ها با یکدیگر برای ژن pal_2 صورت گرفت (داده‌ها نمایش داده نشده است)، که نتایج حاصل از محاسبه این پارامتر در ژن pal_2 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 pal_2 و *ndhf* مشاهده شد که گونه‌های *Achille amillefolium* و *Matricaria chammomila* نزدیکترین گونه‌های این دو جنس به یکدیگر در زیرخانواده *Anthemidea* 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 pal_2 با توجه به اینکه در ژنوم هسته‌ای گیاه قرار گرفته طبیعتا نسبت به ژن‌های کلروپلاستی بسیار متنوع‌تر می‌باشد و شاید بتوان گفت که رسم نمودار خوشه‌ای بر اساس آن‌ها به همراه ژن‌های کلروپلاستی می‌تواند نتایج تکمیل کننده‌ای در مطالعات آتی داشته باشد. بررسی درصد شباهت بین جنس-های 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 pal_2، این ژن در طول تکامل بین جنس‌های خانواده *Asteraceae* حفاظت شده-تر بوده است (شکل۲).

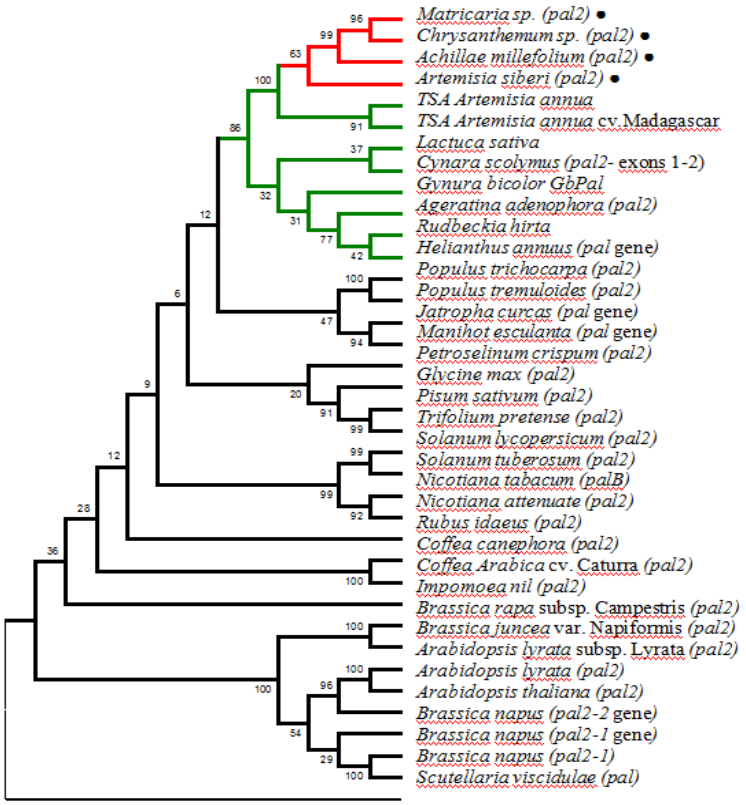
مقایسه درصد تنوع و نیز فاصله ژنتیکی بر اساس دو پارامتر K2P و P-distance نیز به خوبی صحت نتایج به دست آمده بر اساس درصد شباهت را تایید می‌کنند. رسم نمودار خوشه‌ای نیز به خوبی نشان داد که جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* از نظر ژن pal_2 به سایر جنس‌های خانواده *Asteraceae* نزدیکتر می-باشند (شکل ۳).

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.15.3]



شکل۲- نتایج حاصل از بررسی درصد شباهت بین جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* با سایر جنس های خانواده *Asteraceae* در ژن *pal2*



شکل ۳- نمودار خوشه‌ای مربوط به روابط ژنتیکی گونه های مهم زیر خانواده *Anthemideae* و جایگاه آنان در ارتباط با گونه‌هایی از سایر جنس‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI بر اساس ژن *pal2*، با استفاده از ضریب Maximum parsimony، جنس‌های مذکور زیرخانواده *Anthemideae* با علامت • مشخص شده است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.15.3]

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 معدود مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است می‌توان به بررسی آنزیم های GPX، APX، CAT و SOD 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 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 pal_2 را در جنس‌هایی که تاکنون هیچ توالی مشابهی برای از 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.

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, Kretzschmar G, Panopoulos N (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenyl prpanoid- drived 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.15.3]