مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤، ٤٧٠-٤٦١

جداسازی و تعیین توالی ژن چالکون سنتاز از گیاه استبرق (*Calotropis procera*)

حوا نژاد علیمرادی.M.Sc[1*]، محسن اسدی خانوکی .M.Sc[2] ، فرخنده رضانژاد .Ph.D[2]

١- دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
٢- دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کرمان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Alimoradih60@yahoo.com

تاریخ دریافت: ١٣٩٣/١١/٧ تاریخ پذیرش: ١٣٩٤/٨/١٩

چکیده

هدف: چالکون سنتاز (CHS) آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی فلاونوئید می‌باشد و نخستین مرحله بیوسنتز فلاونوئیدها را کاتالیز می‌کند. هدف این تحقیق شناسایی ژن چالکون سنتاز در گیاه استبرق بود.

مواد و روش‌ها: DNA ژنومی از برگ‌های تازه استخراج و به‌عنوان الگو جهت PCR استفاده شد. آغازگرها بر اساس نواحی حفاظت شده این ژن از سایر گیاهان طراحی شدند. فراورده حاصل از PCR تخلیص و توالی‌یابی شد. نتایج تعیین توالی ابتدا هم‌ردیف و سپس با توالی‌های برخی ژن‌های CHS موجود در بانک ژن و با نرم‌افزار DNAMAN مقایسه شد. درخت فیلوژنتیکی مربوط به توالی CHS در استبرق و گونه‌های گیاهی دیگر با نرم افزار MEGA 6 و به‌روش Neighbor-joining رسم شد.

نتایج: نتایج PCR بیانگر وجود ژن چالکون سنتاز و تکثیر قطعه ٥٧٢ نوکلئوتیدی متعلق به اگزون شماره٢ این ژن بود. این با نام CpCHS و شماره بازیابی (KM878672) در بانک ژن ثبت شد. مقایسه توالی CpCHS با سایر توالی‌های ژن CHS نشان داد این ژن با توالی CHS در Arabidopsis thaliana ٥٩ درصد، Nicotiana tabacum ٦٣ درصد، Olea europaea ٦٣ درصد و Petunia x hybrida ٦٤ درصد یکسانی دارد. بیشترین یکسانی با توالی ژن CHS در Catharanthus roseus و برابر با ٦٨ درصد بود. رسم درخت فیلوژنی نشان داد که CpCHS با ژن CHS گیاه Catharanthus roseus در یک شاخه قرار دارد.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می‌دهد که به احتمال CpCHS نیز همانند سایر ژن‌های CHS در تنظیم مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها نقش دارد و شناسایی این ژن در گیاه استبرق منجر به یافتن راه‌کاری کارآمد جهت افزایش تولید مواد مؤثره دارویی و ارزشمند این گیاه باشد.

واژگان کلیدی: استبرق، درخت فیلوژنی، توالی یابی، چالکون سنتاز

مقدمه

استبرق (*Calotropis procera*) که متعلق به تیره‌ی Asclepiadaceae است (۱)، درختچه‌ای افراشته یا درختی کوچک، پایا و همیشه سبز به ارتفاع تا ۵ متر می‌باشد (۲). عصاره ریشه، ساقه و برگ گیاه استبرق یک منبع مهمی از ترکیبات ثانویه مانند فلاونوئیدها است (۳). این گیاه خاص مناطق باز با رقابت کم است که به‌صورت خودرو و تحت شرایط آب و هوایی فوق العاده گرم در نواحی گرمسیری و معتدل گرم رشد می‌کند (۴).

از بافت‌های استبرق به‌ویژه، پوست ریشه، در درمان بیماری‌های مختلفی شامل جذام، تب، خونریزی رحم، مالاریا و مارگزیدگی استفاده می‌شود (۵). گزارش شده است که گیاه استبرق جهت جداسازی و برداشت فلزات سنگین مانند کادمیم و سرب از خاک، فاضلاب‌های صنعتی یا آب‌های آلوده زیرزمینی نیز به‌کار برده می‌شود (۶). تمام بخش‌های گیاه به‌ویژه دانه‌ها و شیرابه، اغلب سمی بوده و دارای آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای متنوعی هستند که تعداد زیادی از آن‌ها در داروسازی و به‌عنوان حشره‌کش‌ها استفاده می‌شوند. شیرابه گیاه دارای خاصیت ضد درد و التیام دهنده زخم و ریشه گیاه دارای خواص ضد بارداری و ضد زخم معده است. خواص حفاظت کبدی و آنتی‌اکسیدانتی گیاه را به فلاونوئیدهای موجود در گل نسبت داده‌اند (۷).

شیرابه گیاه استبرق منبع مهمی از ترکیبات جدید گسترده مانند فلاونوئید کوئرستین، گلیکوزیدهای فلاونوئیدی، آنتوسیانین، رزین، آنزیم‌های هضم کننده پروتئین در شیرابه، تانن، استرول، ساپونین و تری ترپنوئیدها می‌باشد (۸ و ۹). آنالیز شیمیایی عصاره‌های برگی گیاه استبرق حضور ترکیباتی از قبیل گلیکوزیدها، پروتئین‌ها، تری ترپنوئیدها، استروئیدها و فلاونوئیدها را آشکار کرد، که بیانگر اهمیت و خواص دارویی گیاه مذکور می‌باشد (۱۰).

بیوسنتز فلاونوئیدها پیچیده و مراحل آنزیمی متعددی در آن درگیر می‌شوند. در مراحل اولیه سنتز فلاونوئیدها، فنیل آلانین مشتق از مسیر شیکمیک به‌وسیله آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی (فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL))، سینامات ۴ هیدروکسیلاز (C4H) و ۴-کومارات-کوانزیم آ لیگاز (4CL) به کوماریل کوانزیم آ تبدیل می‌شود. چالکون سنتاز (CHS)، اولین آنزیم سنتز فلاونوئید موجب ترکیب کوماریل کوانزیم آ با سه مولکول مالونیل کوانزیم آ حاصل از استیل کوانزیم آ برای تشکیل نارینژنین می‌شود. سپس نارینژنین چالکون به‌وسیله چالکون ایزومراز (CHI) به نارینژنین تبدیل می‌شود. نارینژنین به‌وسیله گلیکوزیله شدن، آسیله شدن و متیله شدن سه حلقه خود به انواع دیگر تبدیل می‌شود (۱۱).

ژن چالکون سنتاز(CHS) اولین بار در سلول‌های کشت شده جعفری (*Petroselinum hortense*) شناسایی شد که پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۲ کیلودالتون را کد می‌کند (۱۲). ساختار ژن CHS در تاکسون‌های مختلف حفظ شده و دارای دو اگزون می‌باشد که توسط یک اینترون جدا شده اند (۱۳). مکان اینترون کاملا حفظ شده اما به لحاظ اندازه در گونه‌های مختلف از کمتر از ۱۰۰ تا چندین کیلو باز متغیر است (۱۴). این آنزیم یک پلی‌کیتید سینتاز ویژه گیاهان می‌باشدکه به‌نام پلی‌کتید نوع III شناخته شده است و یک خانواده ژنی را شامل می‌شود که از نظر ساختاری و عملکردی مشابه یکدیگرند (۱۵). تنش‌های محیطی مثل نور، پرتوی فرابنفش، آسیب دیدگی و زخم، پاتوژن‌ها و عصاره‌های قارچی باعث القای بیان آن می‌شوند (۱۶).

ژن‌های رمز کننده چالکون سنتاز از طیف گسترده ای از گیاهان شامل خزه ها، سرخس‌ها، بازدانگان، دولپه‌ای و تک لپه‌ای‌ها جداسازی شده‌اند(۱۷). آنزیم چالکون سنتاز که حاصل بیان ژن CHS می‌باشد به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوشیمیایی ترکیبات فلاونوئیدی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۸). فلاونوئید از جنبه‌های گوناگون اثرات متنوعی بر زیست‌شناسی گیاهان دارند و دامنه وسیعی از عملکردها را در فیزیولوژی، بیوشیمی، اکولوژی از قبیل حفاظت در مقابل شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی، شوری، پرتو فرابنفش، آلودگی هوا، دگرآسیبی (آللوپاتی)، مقاومت در برابر پاتوژن‌ها، رنگ گل و جلب گرده‌افشان‌ها، هم‌زیستی و به‌عنوان مارکرهای بیولوژیکی در مطالعات کیموتاکسی، رشد نمو دانه‌های گرده و گیاه به‌طور کلی، انتقال قطبی اکسین و ... بر عهده دارند (۲۱-۱۹). از دیگر خصوصیات مهم و قابل توجه فلاونوئید ارزش غذایی و اهمیت دارویی آن‌ها برای انسان مانند خواص ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند (۱۹). تاکنون هیچ گزارشی در مورد توالی ژن (خانواده ژنی) چالکون سنتاز از گیاه استبرق منتشر نشده است. با توجه به نقش‌های اساسی ذکر شده برای این ترکیبات و نیز مقاومت بالای این گیاه در مناطق بسیار گرم و خشک و نیز خواص دارویی و رنگ خاص گل آن، مطالعه ساختار

و عملکرد این ژن در گیاه مورد مطالعه دارای اهمیت می‌باشد. همچنین می‌توان با افزایش بیان آن، گامی موثر در یافتن راه‌کارهای کارآمد جهت افزایش تولید مواد موثره دارویی و ارزشمند این گیاه پیدا کرد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد استفاده: بذر استبرق (*Calotropis procera*) از جنوب استان کرمان (شهرستان کهنوج) جمع آوری شد. در تیرماه، بذرها در گلدان‌هایی حاوی مخلوط ۱:۱ از خاک و ماسه کشت شدند. برای مطالعات مولکولی از بافت‌های تازه برگ و ساقه در مراحل جوانی (مرحله ۲ تا ۳ برگی) به‌روش زیر استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی از برگ تازه گیاه استبرق با استفاده از کیت استخراج DNA (Qiagene, DNeasy Plant Mini Kit, Germany) به روش ذکر شده در کیت استخراج شد. برای بررسی حضور و ارزیابی خلوص DNA از روش بیوفتومتری (Eppendorf AG, Germany) و الکتروفورز افقی (BIO-RAD powerpac, USA) روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (۲۲).

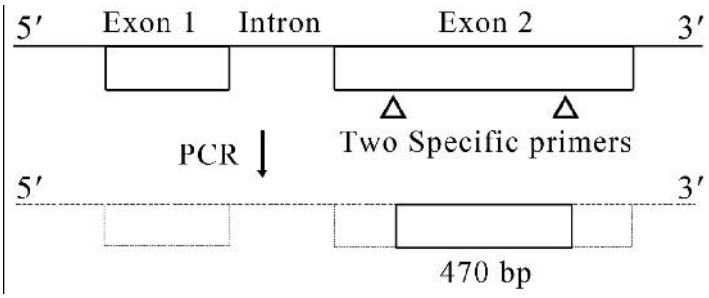
طراحی آغازگر: اولین مرحله در شناسایی ژن، طراحی آغازگرهای مناسب و استفاده از آن‌ها در واکنش PCR است. از آنجا که توالی ژن مورد نظر نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های ژن موجود از سایر گیاهان طراحی شدند. اگرچه اولویت با گیاهان هم جنس یا هم خانواده است اما از آنجا که تاکنون این ژن در هیچ گیاه هم جنس یا هم خانواده گیاه مورد مطالعه شناسایی نشده بود از توالی ژن چالکون سنتاز در گیاهان سایر خانواده‌ها استفاده شد.

به این منظور توالی ژن CHS در Catharanthus roseus (Accession no: AJ131813.1)، Eustoma grandiflorum (Accession no: AB078954.1)، Gentiana triflora (Accession no: D38043.1) و Solanum tuberosum (Accession no: U47738.1) از بانک ژن NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) گرفته شد. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 صورت گرفت. براساس نقاط حفاظت شده موجود، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner طراحی گردیدند و سپس مناسب بودن آن‌ها به‌وسیله نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت. توالی آغازگرها به‌صورت زیر می‌باشد:

F-CpCHS< 5′- CATGATGTACCAACAAGG -3′ >

R- CpCHS< 5′- TGAACAAAACACAAGCACT -3′ >

شکل ۱ نشان دهنده ساختار ژن در سایر گیاهان و مکان تقریبی آغازگرهای اختصاصی طراحی شده است. سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت تکاپوزیست صورت گرفت. طبق روش شرکت، محلول ذخیره و محلول کاری با استفاده از آغازگرهای لیوفیلیزه تهیه شدند.



شکل ۱: شکل شماتیک ژن CHS و محل تقریبی قرار گرفتن آغازگرهای طراحی شده.

شناسایی ژن چالکون سنتاز با PCR: به این منظور از DNA ژنومی استخراج شده به‌عنوان DNA الگو استفاده شد. برای PCR، مقدار ۲۰۰ نانوگرم از DNA و ۱ میکرولیتر از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار ، درون لوله لیوفیلیزه PCR (BIONEER, AccuPowerR PCR PreMix, Korea) ریخته و با آب دوبارتقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن، به‌طور کامل مخلوط شد. انجام PCR توسط ترموسایکلر مدل PTC (1148MJ Mini Personal Termal Cycler BioRad, USA) و با مرحله واسرشتگی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد

آغاز گردید و با انجام ۳۰ چرخه با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال، ۵۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و دمای طویل شدن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه ادامه یافت و با مرحله طویل شدن یه مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید. پس از انجام PCR، کیفیت محصول برروی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

تخلیص و توالی‌یابی محصول PCR: به‌منظور تخلیص از روی ژل و تعیین توالی قطعه تکثیر شده، ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR به‌همراه ۲۰ میکرولیتر از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد.

آنالیز آماری

نتایج حاصل از تعیین توالی ابتدا با نرم‌افزارهای BLAST و ClustalW آرایه بندی شده و سپس توالی نوکلئوتیدی و توالی‌های برخی از ژن‌های CHS موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN 5.2.2 مقایسه و میزان یکسانی آن بررسی شد. با استفاده از نرم افزار MEGA 6 و به‌روش Neighbor-joining درخت فیلوژنتیکی مربوط به ژن CHS در استبرق و ۳۱ گونه گیاهی دیگر رسم گردید (جدول۱).

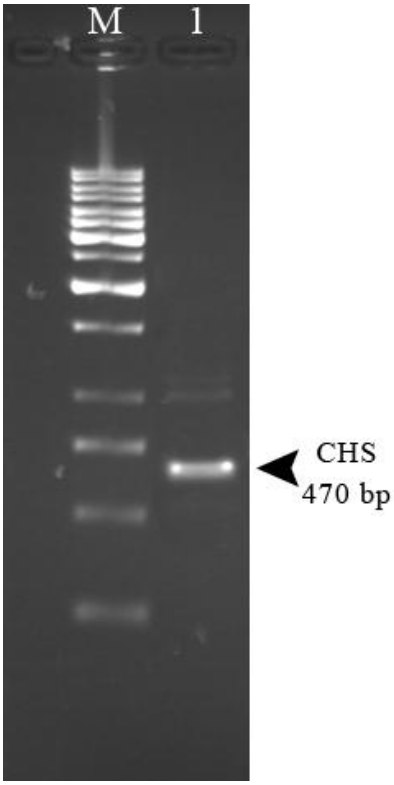
نتایج

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب از نیازهای بنیادی پژوهش‌های مولکولی است. استخراج از بافت گیاه به‌علت حضور کربوهیدرات‌ها، تانن‌ها، ترکیبات پلی‌فنلی و پروتئین‌ها که بر کیفیت DNA اثر منفی می‌گذارد با مشکلاتی روبروست. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده و خلوص آن و عدم شکستگی و مناسب بودن برای واکنش PCR، ۶ میکرولیتر DNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری و ۱ میکرولیتر ژل رد درون چاهک ژل آگارز ۱ درصد تخلیه و الکتروفورز افقی انجام شد. وجود تنها یک باند در نیم‌رخ الکتروفورزی، دلیلی بر کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است. کمیت آن با دستگاه بیوفتومتر سنجیده شد که شاخص خلوص (Purity index) در تابش دو طول موج مختلف ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر عدد ۱/۷۷ تا ۲/۰۲ را نشان می‌دهد که DNA ژنومی از کمیت مناسبی برخوردار است.

الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن CHS به طول تقریبی ۵۷۰ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل ۲). این مطلب نشان دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به‌خصوص دمای اتصال) می‌باشد.

جدول ۱: شماره بازیابی ژن‌های CHS متعلق به گونه‌های مختلف (با استفاده از سایت NCBI)

گونه گیاهی	ACCESSION NUMBER
Arabidopsis thaliana (L.) Heynh	AF112086
Calotropis procera (Ait.) R. Br.	KM878672
Capsella rubella Reut.	AF112106
Capsicum annuum L.	JN808444
Catharanthus roseus (L.) G. Don	AJ131813
Ceratopteris thalictroides (L.) *Brongn.*	JX027616
Citrus sinensis (L.) Osbeck	EU410483
Dryopteris erythrosora (D.C.Eaton) Kuntze	KJ135628
Equisetum arvense L.	AB030004
Ginkgo biloba L.	AY647263
Ipomoea amnicola Morong	HQ142023
Lilium hybrid	HM622754
Lupinus luteus L.	DQ507392
Morus alba var. multicaulis (Perr.) Loudon	KJ013407
Narcissus tazetta var. chinensis M. Roem	JQ796710
Nicotiana tabacum L.	KF927021
Olea europaea L.	KF935224
Oryza sativa L.	AB058397
Petunia x hybrida hort. ex E. Vilm	AB678720
Physcomitrium patens (Hedw.) Mitt.	DQ275627
Picea abies (L.) H.Karst.	DQ371806
Pisum sativum L.	D88262
Populus alba L.	DQ371802
Psilotum nudum (L.) Beauv.	AB022682
Sisymbrium irio L.	AF144541
Solanum lycopersicum L.	NM_00124710
Solanum tuberosum L.	HQ659493
Streptomyces griseus	AB018074
Thinopyrum ponticum Podp.	AY286094
Thlaspi arvense L.	AF144535
Triticum aestivum L.	AY286096
Vitis vinifera L.	AB015872



شکل ۲: تکثیر بخشی از ژن CHSدر گیاه استبرق توسط PCR. ۱) محصول PCR ۵۷۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای F-CpCHS و R-CpCHS. M) نشانگر مولکولی DNA 1kb (Fermentase).

نتایج توالی یابی محصولات PCR: نتایج تعیین توالی نشان دهنده خوانش ۵۷۲ نوکلئوتید مربوط به اگزون ۲ ژن CHS در استبرق بود. این ژن با نام CpCHS و با شماره بازیابی (Accession no. KM878672) در بانک ژن NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ثبت گردید. با استفاده از نرم افزار BLAST مشخص شد که CpCHS اولین توالی نوکلئوتیدی گزارش شده ژن چالکون سنتاز در زیر خانواده Asclepiadoideae است (شکل۳).

بررسی هومولوژی این توالی با توالی‌های ژنCHS در برخی از گیاهان و با استفاده از نرم افزار DNAMAN 5.2.2 انجام شد. این نتایج نشان داد این توالی نوکلئوتیدی با توالی ژن CHS درArabidopsis thaliana(Accession no. NM_121396) ۵۹ درصد و با Nicotiana tabacum (Accession no. KF927021)، Olea europaea (Accession no. KF935224) و Petunia x hybrida (Accession no. X04080) به‌ترتیب ۶۳، ۶۳ و ۶۴ درصد یکسانی دارد. بیشترین یکسانی این توالی نوکلئوتیدی با توالی ژن CHS در catharanthus roseus (Accession no. AJ131813) و برابر با ۶۸ درصد بود. ماتریس هومولوژی توالی نوکلئوتیدی CpCHS و گونه‌های ذکر شده، آورده شده است (شکل‌های۴ و۵).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی CpCHS. رسم درخت فیلوژنتیکی مربوط به ژن CHS در استبرق و ۳۱ گونه گیاهی دیگر (جدول۱) و با استفاده از نرم افزار MEGA 6 و به‌روش Neighbor-joining صورت گرفت (شکل ۶).

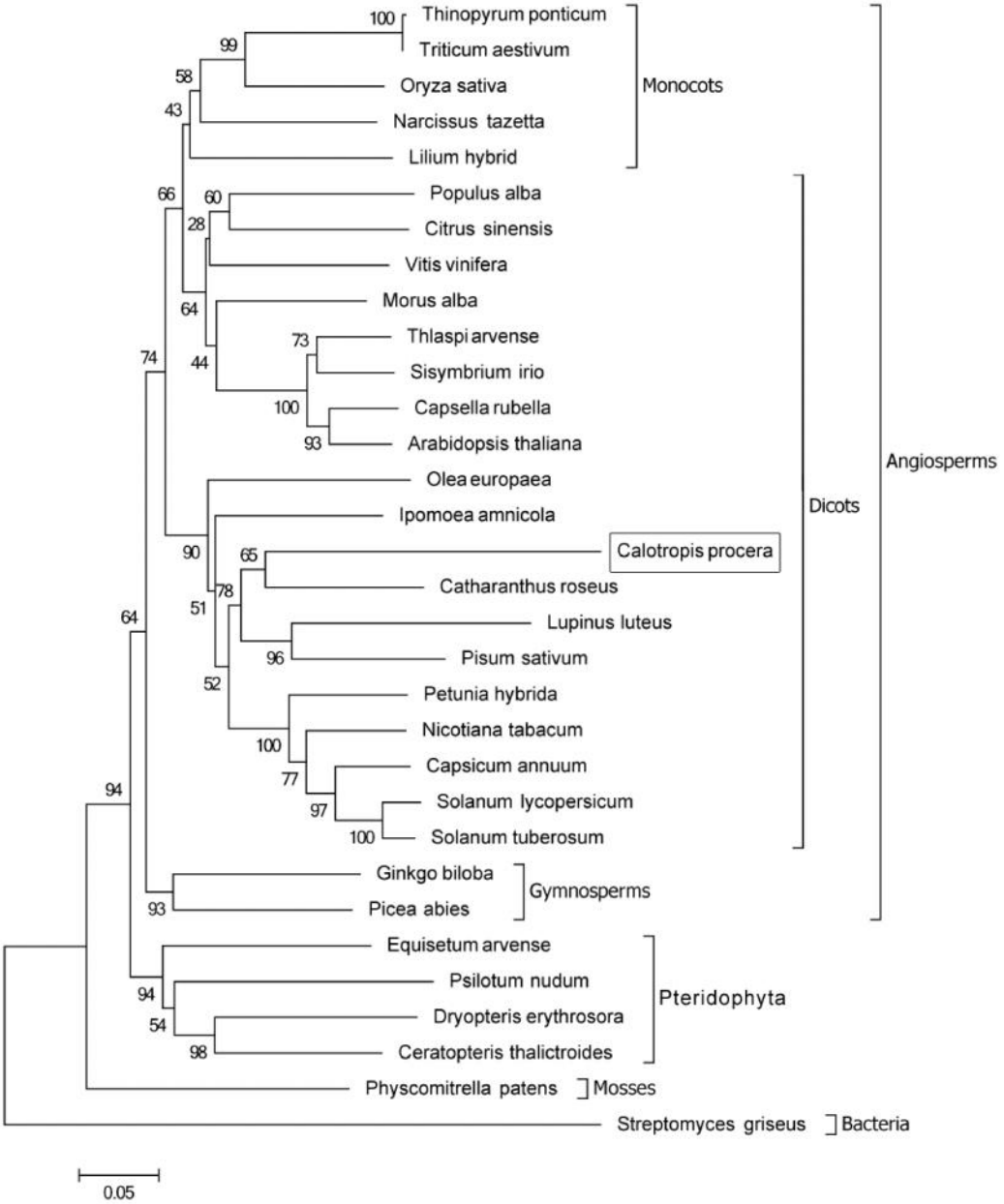
```
1     TTTTATGATGTACCAACAAGCTTCTTCCGGAGCCGCTATGGTTCTCCGATTAGCCAAAGACTTACCTCAAAACAATAAAGCTTCAACGGTTTTAGTT
1      F  M  M  Y  Q  Q  G  C  S  G  G  G  M  V  L  R  L  A  K  D  L  A  E  N  N  K  G  S  R  V  L  V

100   GTTTGTTCTCAAATAACGGCTACTCTTTTCCGTGCTCCTAGCGTGGAACATTTGGACACACTTCTCCGACAAATGTTGTTTGCAGACGCTGCAAGTGCA
34     V  C  S  E  I  T  A  T  L  F  R  G  P  S  V  E  H  L  D  T  L  L  G  Q  M  L  F  G  D  G  A  S  A

199   ATCATTGTCGGGTCGGATCCTATTCTTGGATTGGAAAATCCATTGTTTGAACTTATTTCAACTTCCCAAACTATCGTCCCTGATAGCCATAAATCCTTG
67     I  I  V  G  S  D  P  I  L  G  L  E  N  P  L  F  E  L  I  S  T  S  Q  T  I  V  P  D  S  H  K  S  L

298   ATTTTACCTTTGACCGAAGGCGGGCTTTCGTTACATTTATCTAAAGATATTCCACAACATATAGGGAAGAATATTGTGAAAGTGTTGGAGGAATCTTTT
100    I  L  P  L  T  E  G  G  L  S  L  H  L  S  K  D  I  P  Q  H  I  G  K  N  I  V  K  V  L  E  E  S  F

397   AATGGTTGTGATGAAGATATTAATGATTGGAACTCCATTTTTTGGGTGTGTCATCCTGGTGGAAGGGCCATTTTGGATGTTGTGGAACAAAAATGTGAC
133    N  G  C  D  E  D  I  N  D  W  N  S  I  F  W  V  C  H  P  G  G  R  A  I  L  D  V  V  E  Q  K  C  D

496   CTGAAACCGGAAAAGTTACGCTCTTCTAGACATATTTTGAGTGAATATGGAAATCTTACTAGTGCTTGTGTTTTGTTCA
166    L  K  P  E  K  L  R  S  S  R  H  I  L  S  E  Y  G  N  L  T  S  A  C  V  L  F
```

شکل ۳: توالی نوکلئوتید و آمینواسید استنباطی ژن CpCHS در استبرق (Accession no. KM878672).

Arabidopsis thaliana	100%
Nicotiana tabacum	70.5% 100%
Olea europaea	71.8% 76.7% 100%
Petunia x hybrida	71.2% 86.8% 76.4% 100%
catharanthus roseus	71.1% 78.3% 74.6% 77.5% 100%
Calotropis procera	59.0% 63.9% 63.6% 64.8% 68.7% 100%

شکل ۴: ماتریس همولوژی توالی نوکلئوتیدی CpCHS (Accession no. KM878672) و ژن CHS در Arabidopsis thaliana (Accession no. NM_121396)، Nicotiana tabacum (Accession no. KF927021)، Olea europaea (Accession no. KF935224)، Petunia x hybrida (Accession no. X04080) و catharanthus roseus (Accession no. AJ131813) با استفاده از نرم افزار DNAMAN 5.2.2.

شکل ۵: مقایسه توالی نوکلئوتیدی CpCHS (Accession no. KM878672) و ژن CHS در Arabidopsis thaliana (Accession no. NM_121396)، Nicotiana tabacum (Accession no. KF927021)، Olea europaea (Accession no. KF935224)، Petunia x hybrida (Accession no. X04080) و Catharanthus roseus (Accession no. AJ131813) با استفاده از نرم افزار DNAMAN 5.2.2. نواحی سیاه رنگ نشان دهنده شباهت ۱۰۰ درصد است.



شکل ۶: درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن چالکون سنتاز در گیاهان مختلف (جدول ۱) با استفاده از نرم افزار MEGA 6 و روش Neighbor-joining. گیاه مورد مطالعه با کادر مشخص شده است.

بحث

فلاونوئیدها از جنبه‌های گوناگون اثرات متنوعی بر زیست‌شناسی گیاهان دارند و دامنه وسیعی از عملکردها را در فیزیولوژی، بیوشیمی، اکولوژی از قبیل حفاظت در مقابل نور ماورای بنفش، ایجاد رنگ گل‌ها و جذب گرده افشان‌ها، به‌عنوان سیگنال‌های مولکولی در برهم‌کنش گیاهان با محیط، به‌عنوان مارکرهای بیولوژیکی در مطالعات کیموتاکسی، دفاع و استحکام گیاه بر عهده دارند. از دیگر خصوصیات مهم و قابل توجه فلاونوئید ارزش غذایی و اهمیت دارویی آن‌ها برای انسان مانند خواص ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند. از دیگر نقش‌های آن‌ها در گیاهان می‌توان به نقش‌های ساختاری در بافت‌های محافظ، عامل جذب کننده حشرات گرده افشان، اشاره نمود (۱۶ و ۲۳).

اخیرا Kumar و همکاران (۱۶) نشان دادند که فلاونوئیدها به‌عنوان ممانعت کننده تنش اکسیداتیو و تنظیم کننده رشد گیاهی عمل می‌کنند. تنش‌های زیستی و غیر زیستی متعددی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ناشی از تنش اکسیداتیو می‌شوند. بیوسنتز فلاونوئیدها به‌طور قابل توجهی

تحت تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد. همچنین نقش آن به‌عنوان تنظیم کننده حرکت و کاتابولیسم اکسین گزارش شده است (۱۶). در مسیر بیوسنتزی فلاونوئید واکنش بیوسنتزی بسیار مهم از تجمع سه مولکول مالونیل COA و یک مولکول P-کوماریل COA است که با دخالت آنزیم چالکون سنتاز (CHS) تولید چالکون می‌کند (۲۴). با توجه به اینکه فلاونوئیدها در خزه‌ها و گیاهان آوندی یافت شده‌اند بنابراین انتظار می‌رود که ژن‌های کد کننده چالکون سنتاز یا آنزیم‌های شبه چالکون سنتاز در ژنوم خزه‌ها و گیاهان عالی حضور داشته باشند. تاکنون ژن‌های چالکون سنتاز متعددی از نوعی خزه، نهان‌زادان آوندی، بازدانگان و نهان‌دانگان کلون شده‌اند (۱۳ و ۲۵).

ژن‌های چالکون سنتازی که تاکنون در گیاهان بررسی شده‌اند دارای یک اینترون و دو اگزون هستند، به‌استثنای این ژن در Antirrhinum majus و Physcomitrellapatens که حاوی دو اینترون می‌باشند (۲۶ و ۲۵). ژن CHS در Zea mays نیز تنها دارای یک اگزون بوده و فاقد اینترون است (۲۷). طول اینترون در Arabidopsis thaliana ۸۵ جفت باز و در Ginkgo biloba۱۱۹ جفت باز است (۲۸ و ۲۹). اینترون‌هایی با طول بلندتر نیز در سویا (۶۴۵ جفت باز) و گردو (۶۶۹ جفت باز) گزارش گردیده است (۳۰ و ۳۱). همچنین مشخص شده است که اینترون در بین کدون سیستئین در نواحی کد کننده که در تمام چالکون سنتازهای بررسی شده حفاظت می‌شود. اگزون شماره ۱ حدود۶۰ باقیمانده آمینواسیدی را کد می‌کند، درحالی‌که اگزون شماره ۲ حدود ۳۴۰ باقیمانده آمینواسیدی را کد می‌کند. تشابه بالای توالی و ساختار ژنی حفاظت شده پیشنهاد می‌کند که ژن‌های چالکون سنتاز ممکن است از یک جد مشترک منشا گرفته باشند (۱۳).

در این پژوهش سعی شد تا ژن CHS در گیاه دارویی استبرق که دارای ترکیبات فلاونوئیدی بسیاری است، شناسایی شود. بدین منظور در ابتدا بر اساس نقاط حفاظت شده موجود در اگزون ۲ توالی ژن‌های CHS در سایر گیاهان، آغازگرهای مناسب طراحی و در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن CHS به‌طول تقریبی ۵۷۰ جفت باز به‌خوبی تکثیر شده است (شکل۲). این مطلب نشان دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها می‌باشد. با توجه به مکان طراحی آغازگرها و قطعه تکثیر شده، به احتمال این قطعه مربوط به اگزون شماره ۲ ژن CHS در گیاه استبرق می‌باشد. نتایج PCR و توالی‌یابی نشان دهنده تکثیر قطعه ۵۷۲ جفت بازی متعلق به ژن CHS در گیاه استبرق (Calotropis procera) بود. بنابراین این ژن CpCHS نام گذاری شد.

هومولوژی قطعه ۵۷۲ جفت بازی CpCHS و برخی دیگر از ژن‌های CHS در سایر گیاهان بررسی شد (شکل ۵). نتایج نشان دهنده شباهت بیش از ۵۹ درصدی این قطعه از ژن با سایر توالی‌ها بود. بیشترین شباهت (۶۸ درصد) بین ژن CpCHS و ژن CHS در گیاه هم خانواده آن یعنی catharanthus roseus مشاهده شد (شکل ۴). همچنین تجزیه و تحلیل نتایج BLASTاین توالی نشان می‌دهد که به احتمال این قطعه متعلق به اگزون ۲ ژن CpCHS می‌باشد. اگزون شماره ۲ از لحاظ طول و توالی نوکلئوتیدی بیشتر از اگزون شماره۱ حفاظت شده است. همچنین چهار باقیمانده آمینواسیدی که به‌عنوان جایگاه های فعال از لحاظ شیمیایی عمل می‌کنند، در اگزون شماره۲ قرار گرفته‌اند و در تمام آنزیم‌های شناسایی شده حفاظت شده هستند (۱۴).

درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌راستایی ژن CpCHS و توالی ژن CHS در برخی دیگر ازگیاهان (جدول ۱) رسم شد. توالی ژن CHS در باکتری Streptomyces griseus به‌عنوان Outgroup در رسم درخت استفاده شد. نتایج نشان دهنده تشکیل پنج شاخه اصلی شامل خزه، سرخس‌ها، بازدانگان، دولپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها بود. CpCHS در شاخه دولپه‌ای‌ها قرار گرفته که خود این شاخه نیز بر اساس گونه‌های گوناگون به چند زیر شاخه تقسیم شده است. برای مثال ژن‌های چالکون سنتاز متعلق به *Capsella rubella*، *A. thaliana*، *Sisymbrium irio* و *Thlaspi arvense* که همگی متلق به خانواده Brassicaceae هستند در یک شاخه قرار گرفته اند. یا گیاهان خانواده Solanaceae شامل *Solanumtuberosum*، *Capsicum annuum*، *Solanum lycopersicum*، *Nicotiana tabacum* و *Petunia x hybrida* که در یک شاخه قرار گرفته‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که ژنCHS در بین شاخه‌های مختلف گیاهی حفاظت شده است و از طرفی در هر گونه گیاهی دارای ویژگی‌های مشخص است. CpCHS نیز در شاخه ژن CHS متعلق به گیاه هم خانواده خود یعنی Catharanthus roseus قرار گرفته است که نشان دهنده جد مشترک احتمالی این دو گونه می‌باشد (شکل۶).

مطالعات نشان می‌دهد که ژن چالکون سنتاز به‌صورت خانواده ژنی در گیاهان وجود دارد اما تاکنون تکامل ژن‌های چالکون در خانواده‌های مختلف نهاندان‌گان به‌طور گسترده مطالعه نشده است (۱۳). بنابراین توالی یابی کامل ژن CHS و بررسی بیان آن در اندام‌ها و مراحل مختلف نمو گیاه می‌تواند نقش مهمی در شناسایی عملکرد و نقش این ژن در گیاه استبرق داشته باشد.

نتیجه‌گیری

عصاره ریشه، ساقه و برگ گیاه استبرق یک منبع مهمی از ترکیبات ثانویه مانند فلاونوئیدها است. فلاونوئیدها درگیاهان نقش‌های مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی، مانند تجمع رنگدانه در گل و حفاظت در برابر آسیب پرتوی فرابنفش و پاتوژن ایفا می‌کنند. چالکون سنتاز، آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها می‌باشد (۱۳) در این پژوهش قطعه ۵۷۲ جفت بازی متعلق به ژن CHS در گیاه استبرق شناسایی شد. این قطعه متعلق به اگزون ۲ ژن CHS بوده و با نام CpCHS و شماره بازیابی (Accession no. KM878672) در بانک ژن ثبت شد. رسم درخت فیلوژنی نشان داد که CpCHS با ژن CHS گیاه *Catharanthus roseus*، گونه هم خانواده خود، در یک شاخه قرار دارد.

منابع

1. Sennblad B, Bremer B. Classification of apocynaceae s.l. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. Systematic biology. 2002; 51(3): 389-409.

2. Zaeifi M, Assadi M. Flora of Iran. Asclepiadaceae. Islamic Republic of Iran, Ministry of Agriculture; N: 28. 2000 .

3. Hassan SW, Bilbis FL, Ladan MJ, Umar RA, et al. Evaluation of Antifungal Activity and Phytochemical Analysis of leaves, Roots and stem bark extracts of Calotropis procera (Asclepiadaceae). Pakistan Journal of Biological Science. 2006; 9(14): 2624-2629.

4. Ghahreman A. Cormophytes of Iran (plant systematic). Tehran: Publication of Center of University; 1994; 2: 841.

5. Varshney A, Bhoi K. Cloth from bast fibre of the Calotropis procera (Aak) plant. Biological wastes. 1988; 26(3): 229-232.

6. D'Souza RJ, Varun M, Masih J, Paul MS. Identification of Calotropis procera L. as a potential phytoaccumulator of heavy metals from contaminated soils in Urban North Central India. Journal of hazardous materials. 2010; 184(1): 457-464.

7. Qureshi AA, Prakash T, Patil T, Viswanath Swamy AH, et al. Hepatoprotective and antioxidant activities of flowers of Calotropis procera (Ait) R. Br. in CCl4 induced hepatic damage. Indian journal of experimental biology. 2007; 45(3): 304-310.

8. Khasawneh MA, Elwy HM, Fawzi NM, Hamza AA, et al. Antioxidant Activity, Lipoxygenase Inhibitory Effect and Polyphenolic Compounds from Calotropis procera (Ait.) R. Br. Research Journal of Phytochemistry. 2011; 5(2): 80-88.

9. Sharma AK, Kharb R, Kaur R. Pharmacognostical aspects of calotropis procera (Ait.) R. Br. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011; 2(3): 480-488.

10. Tiwari A, Singh S, Singh S. Chemical Analysis of Leaf Extracts of Calotropis procera. International Journal of Scientific and Research Publications. 2014; 4(1) : 407-424.

11. Roslan ND, Tan C-S, Ismail I, Zainal Z. cDNA cloning and expression analysis of the chalcone synthase gene (CHS) from'polygonum minus. Australian Journal of Crop Science. 2013; 7(6): 777.

12. Reimold U, Kroger M, Kreuzaler F, Hahlbrock K. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. The EMBO journal. 1983; 2(10): 1801-1805.

13. Huang J-X, Qu L-J, Yang J, Yin H, et al. A preliminary study on the origin and evolution of chalcone synthase (CHS) gene in angiosperms. Acta botanica sinica-English Edition-. 2004; 46(1): 10-19.

14. Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, et al. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. Nature structural biology. 1999; 6(8): 775-784.

15. Eckermann C, Schroder G, Eckermann S, Strack D, et al. Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. Phytochemistry. 2003; 62(3): 271-286.

16. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. TheScientificWorldJournal. 2013; 2013(2013): 162750.

17. Niesbach-Klösgen U, Barzen E, Bernhardt J, Rohde W, et al. Chalcone synthase genes in plants: a

tool to study evolutionary relationships. Journal of molecular evolution. 1987; 26(3): 213-225.

18. Bohm, Bruce A. 1998. Introduction to flavonoids: Australia: Harwood academic publishers. 1: 503.

19. Bourgaud, F, A Gravot, S Milesi, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 2001; 161(5): 839-851.

20. Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S. Antioxidant activity of a ginger extract (Zingiber officinale). Food chemistry. 2007; 102(3): 764-770.

21. Rezanejad F. Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of Thuja orientalis L.(Cupressaceae). Grana. 2009; 48(3): 205-213.

22. Sambrook J, Russell DW.Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1: 628.

23. Forkmann G. Genetics of flavonoids. The Flavonoids: Springer; 1994; 537-564.

24. Lee YJ, Kim JH, Kim BG, Lim Y, et al. Characterization of flavone synthase I from rice. BMB Reports. 2008; 41(1): 68-71.

25. Jiang C, Schommer CK, Kim SY, Suh DY. Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss, Physcomitrella patens . Phytochemistry. 2006; 67(23): 2531-2540.

26. Sommer H, Saedler H. Structure of the chalcone synthase gene of Antirrhinum majus. Molecular Genetics and Genomics. 1986; 202(3): 429-434.

27. Ma W, Wu Y, Wu M, Ren Z, et al. Cloning, characterization and expression of chalcone synthase from medicinal plant Rhus chinensis. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 2013; 24(1). 18-24.

28. Feinbaum RL, Ausubel FM. Transcriptional regulation of the Arabidopsis thaliana chalcone synthase gene. Molecular and Cellular Biology. 1988; 8(5): 1985-1992.

29. Pang Y, Shen G ,Wu W, Liu X, et al. Characterization and expression of chalcone synthase gene from Ginkgo biloba. Plant Science. 2005; 168(6): 1525-1531.

30. Akada S, Kung SD, Dube SK. Nucleotide sequence of a soybean chalcone synthase gene with a possible role in ultraviolet-B sensitivity, Gmchs6. Plant Physiology. 1993; 102(2): 699-701.

31. Claudot A-C, Ernst D, Sandermann Jr H, Drouet A. Cloning and characterization of two members of the chalcone synthase gene family from walnut. Plant Physiology and Biochemistry. 1999; 37(1): 721-730.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2015; 6(4): 461-470 *Original Article*

Isolation and Sequencing of Chalcone Synthase (CHS) in *Calotropis procera*

Nejad-Alimoradi H, M.Sc.[1*], Asadi-Khanouki M, M.Sc.[2], Rezanejad F, Ph.D.[2]

1. Department of Biology, Payamnoor University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

* Email corresponding author: Alimoradih60@yahoo.com

Received: 27 Jan. 2015 Accepted: 10 Nov. 2015

Abstract

Aim: Chalcone synthase (CHS) is a key enzyme in the flavonoid biosynthesis pathway. This enzyme catalyses the first step of flavonoid biosynthesis pathway. The purpose of this study was to identify chalcone synthase gene in Calotropis procera.

Material and Methods: The genomic DNA was extracted from fresh leaves and used as template in PCR. Primers were designed according to the conserved regions of this gene in other plants. The PCR product was purified and sequenced. Multiple sequence alignment and sequence homology analyses were carried out with DNAMAN software using CHS sequences retrieved from Genbank. A neighbor-joining phylogenetic tree based on CpCHS and other CHS sequences were constructed using MEGA6 software.

Results: PCR results indicated the existence of this gene and amplification of 570 nucleotides fragment that belong to exon2 of CHS gene. This gene was denominated as CpCHS and deposited at the GenBank accession KM878672. Comparison analysis based on nucleotide sequence alignment revealed that CpCHS shared a high degree of similarity to CHS from Arabidopsis thaliana (59%), Nicotiana tabacum (63%), Olea europaea (63%) and Petunia X hybrida (64%). Maximum similarity was observed between CpCHS and CHS from Catharanthus roseus (67%). Phylogenetic analysis showed that CpCHS was grouped into a branch with Catharanthus roseus.

Conclusion: These results suggest that CpCHS may play a similar role as other CHS in regulation of flavonoids biosynthesis pathway. Identification of this gene is an effective step which may lead to increase in the accumulation of useful medicinal extract in this plant.

Key words: Calotropis procera, Chalcone synthase, Phylogenetic tree, Sequencing