مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 1، بهار و تابستان 1391)

شناسایی و کلون‌سازی خانواده ژنی چالکون سنتاز گیاه خار مریم (*Silybum marianum* L.)

سپیده سنجری[1]، زهرا سادات شبّر[2*]، محسن ابراهیمی[3]، طاهره حسنلو[2]، سیّد احمد سادات نوری[4]

[1]فارغ التحصیل کارشناسی ارشد اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، استان تهران، شهرستان پاکدشت.
[2]استادیار بخش فیزیولوژی مولکولی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، استان البرز، کرج.
[3]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، استان تهران، شهرستان پاکدشت.
[4]دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، استان تهران، شهرستان پاکدشت.
تاریخ دریافت: 1390/09/28، تاریخ پذیرش: 1391/02/18

چکیده

سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی است که از دانه‌های گیاه خارمریم به‌دست می‌آید و دارای خواص دارویی متعددی می‌باشد. چالکون‌سنتاز نقش کلیدی در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها دارد بنابراین شناسایی ژن رمزده آن گامی مهم در مهندسی متابولوم گیاه خارمریم می‌باشد. بدین‌منظور پس از جمع‌آوری داده‌های توالی موجود در مورد خانواده ژنی چالکون‌سنتاز در سایر گیاهان، همردیفی آن‌ها و تعیین نواحی حفظ شده، چهار آغازگر دژنره بر اساس این نواحی طراحی شد. قطعات ژنی تکثیر شده در PCR با استفاده از این جفت آغازگر از ژنوتیپ بومی منطقه برازجان و رقم اصلاح شده مجار در ناقل مناسب همسانه‌سازی و سپس تعیین توالی شدند. مطالعه توالی نوکلئوتیدی حاصل و توالی اسیدآمینه‌ای آن‌ها، منجر به شناسایی دو عضو از خانواده ژنی چالکون‌سنتاز در این گیاه گردید. بر اساس نقاط متنوع، شش آغازگر اختصاصی برای هریک از اعضا جهت تکثیر cDNA از روی RNAی کل رقم مجار درسیستم RACE طراحی شد. قطعات cDNAی تکثیر شده در 3'RACE و 5'RACE در ناقل مناسب همسانه سازی و سپس تعیین توالی شدند. توالی کامل cDNAی ژن چالکون سنتاز از همپوشانی توالی‌های 5'RACE و 3'RACE عضو یک شناسایی گردید که قالب باز خواندنی آن دارای 1239 باز بوده و شامل اگزون یک (190 باز) و اگزون دو (1049 باز) می‌باشد که به ترتیب 63 و 349 اسیدآمینه را رمز می‌کنند. مطالعه کل توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای به‌دست آمده، منجربه شناسایی سه عضو از خانواده ژنی چالکون‌سنتاز در این گیاه برای اولین بار شد که دارای دومین‌های حفظ شده انتهای آمین و کربوکسیل چالکون سنتاز می‌باشند.

کلمات کلیدی: *چالکون سنتاز، خارمریم، همسانه‌سازی، RACE، تعیین توالی.*

* نویسنده مسئول: زهرا سادات شبّر تلفن: 0263-2709652 Email: shobbar@abrii.ac.ir

مقدمه

فلاونوئیدها[1] گروه خاصی از محصولات طبیعی پلی‌فنلی با 15 کربن در گیاهان هستند که سه حلقه A، B و C اختصاصی آنها، از پیش-سازهای مشتق از فنیل پروپانوئید و استات تولید می‌شوند. این مواد اعمال فیزیولوژیکی و اکولوژیکی مختلفی در گیاهان را موجب می‌شوند (Kubasek *et al.*, 1992). مهمترین فلاونوئیدهای میوه گیاه خارمریم (از خانواده کاسنی)[2] عبارتند از سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و یک پیش ساز به نام تاکسی‌فولین که مجموعه آن‌ها تحت عنوان سیلی‌مارین شناخته شده و از عصاره متانولی دانه گیاه خارمریم استخراج می‌شود (Narayana *et al.*, 2001). سیلی‌مارین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و به‌عنوان یک داروی موثر در درمان مسمومیت کبدی، سرطان، هپاتیت و ایدز شناخته شده است (Schonfeld *et al.*, 1997). در این میان نقش آنزیم چالکون سنتاز به عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوشیمیایی ترکیبات فلاونوئیدی از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد (Bourgand *et al.*, 2001) و واکنش تبدیل یک مولکول P- کوماریل کوآنزیم A و سه مولکول مالونیل کوآنزیم A به نارینجین چالکون را کاتالیز می‌کند که نخستین مرحله در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید می‌باشد که تولید فلاونوئیدها را هدایت می‌کند (Ji *et al.*, 2002).

آنزیم چالکون سنتاز در اکثر گیاهان، مانند بسیاری از دیگر آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیسم‌های ثانویه توسط خانواده‌های کوچک ژنی رمز می‌شود. ژن‌های چالکون سنتاز که تاکنون در گیاهان مطالعه شده‌اند، دارای دو اگزون و یک اینترون بوده‌اند به غیر از گل میمون[3] که دارای یک اینترون دیگر در اگزون دو است (Sommer and Saedler, 1986). توالی نوکلئوتیدی اگزون دو نسبت به اگزون یک حفظ شده تر است. اگزون یک و اگزون دو به ترتیب 37-64 و حدود 340 اسید آمینه را رمز می‌کنند. مکان اینترون کاملاً حفظ شده (از قانون GT-AG پیروی می‌کند) اما به لحاظ اندازه در گونه‌های مختلف از کمتر از 100 تا چندین کیلوباز متغیر است (Ferrer *et al.*, 1999).

به نظر می‌رسد ژن‌های رمزکننده چالکون سنتاز و محصولات واکنش مربوطه به‌طور فراگیر در تمامی گیاهان وجود دارند (Koes *et al.*, 1994). ژن‌های رمزکننده چالکون سنتاز از طیف گسترده‌ای از گیاهان شامل خزه‌ها، سرخس‌ها، بازدانگان، دولپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها جداسازی شده‌اند (Niesbach-Klosgen *et al.*, 1987; Fliegman *et al.*, 1992). اما تا کنون هیچ گزارشی در مورد توالی ژن/خانواده ژنی چالکون سنتاز از گیاه خارمریم یا گیاهانی از جنس مربوطه (Silybum) منتشر نشده است. شناسایی خانواده ژنی چالکون سنتاز گیاه خارمریم می‌تواند گامی مؤثر در یافتن راهکارهای کارآمد برای افزایش

[1] Flavones
[2] Asteraceae
[3] *Antirrhinum majus*

تولید مواد مؤثره دارویی و ارزشمند این گیاه باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای ژنوتیپ بومی (جمع آوری شده از منطقه برازجان) و رقم اصلاح شده مجار (منشأ مجارستان) از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تهیه شد. بذرها طبق روش حسنلو و همکاران (Hasanloo *et al*, 2005) ضدعفونی و برای ایجاد دانه‌رست در محیط کشت موراشیگ و اسکوک (Murashige and Skoog, 1962) (شرکتDuchefa Biocheme) کشت شدند و پس از مرحله چهاربرگی به گلدان‌های حاوی خاک مزرعه منتقل شده و در گلخانه (25- 30C°~) نگهداری شدند.

هم‌ردیفی توالی‌های مربوطه و طراحی آغازگر[1]

اطلاعات موجود در مورد خانواده ژنی چالکون سنتاز در گیاهان مختلف از پایگاه‌های داده‌های توالی[2] جمع آوری و دسته بندی شدند. سپس توالی‌های مربوطه با استفاده از نرم افزار Clustal W هم‌ردیف و بر اساس نواحی حفظ شده این خانواده ژنی به‌ویژه در گیاهان همان تیره (جدول 1) دو آغازگر دژنره رو به جلو (F1 و F2) و دو آغازگر دژنره معکوس (R1 وR2) طراحی شد (شکل1 ، جدول 2).

[1] Primer
[2] National Center of Biotechnology Information (NCBI)

استخراج DNA ژنومی، تکثیر قطعات ژنی و همسانه سازی قطعات موردنظر

از برگ گیاه ژنوتیپ منطقه برازجان و رقم مجار در مرحله رزتی نمونه برداری شد و DNA ژنومی آن‌ها طبق دستورالعمل، با کیت Core-One^{TM} Plant Genomic DNA Isolation (شرکت CoreBio) استخراج شدند.

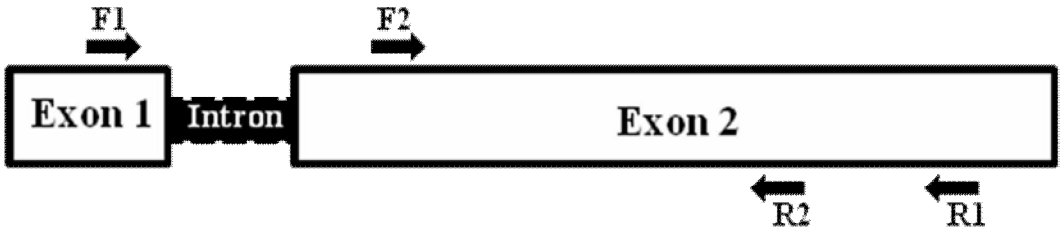
شرایط مناسب جهت تکثیر قطعات ژنی مورد نظر از روی DNAی ژنومی هر دو ژنوتیپ با استفاده از جفت آغازگرهای F1R1، F1R2، F2R1 و F2R2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[3] (دستگاه ترموسایکلر شرکت BIO-RAD مدل icycler) تعیین شد. قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای F2R1 و F1R2 به‌منظور تعیین توالی، در ناقل pGEM-T Easy Vector (شرکت Promega) وارد و در باکتری DH5α همسانه سازی شدند. پلاسمیدها طبق دستورالعمل کیت AccuPrep Plasmid Mini Extraction (شرکت Bioneer) استخراج شدند و برای اطمینان از حضور قطعات وارد شده در ناقل، هضم آنزیمی با آنزیم *Eco*RI (شرکت Roche) صورت گرفت و تعیین توالی توسط شرکت ماکرو ژن[4] کشور کره انجام شد.

[3] Polymerase chain reaction (PCR)
[4] Macro gene

جدول 1- شماره دست یابی توالی‌های ژن چالکون‌سنتاز از تیره آستراسه در بانک داده‌های توالی **NCBI.**

Table 1- Accession number of asteraceae's chalcone synthase gene family in NCBI.

نام گیاه **Plant name**	شماره دست یابی **Accession No.**
Gerbera hybrida1	Z38098
Gerbera hybrida 2	Z38096
Callistephus chinensis	Z67988
Chrysanthemum x morifolium	DQ521272



شکل 1- نمایش نمادین موقعیت آغازگرهای دژنره روی ژن چالکون سنتاز.

Figure 1- Schematic presentation of the degenerate primers positions on chalcone synthase gene.

طراحی آغازگرهای اختصاصی[1] ژن چالکون سنتاز

توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای F1R2 و F2R1 از روی DNAی ژنوتیپ بومی برازجان و رقم مجار، توسط نرم افزار Clustal W هم‌ردیف شدند. بر اساس نقاط متنوع آن‌ها، سه آغازگراختصاصی رو به جلو و سه آغازگر اختصاصی برگشتی برای هر یک جهت انجام PCR و سیستم RACE، با استفاده از نسخه پنجم نرم افزار Oligo طراحی شد (جدول2) .

تکثیر سریع انتهای cDNA (RACE)[2] و همسانه سازی آن

ابتدا استخراج RNA کل[3] از بافت تر گلبرگ رقم اصلاح شده مجار با استفاده از محلول ترایزول[4] (شرکت Invitrogen) انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA توسط دستگاه پیکودارپ (شرکت picodrop مدل picopet 01) و همچنین الکتروفورز ژلی بررسی‌شد و به‌منظور حذف آلودگی DNA در استخراج RNAی کل از آنزیم DNase (شرکت Promega) استفاده شد سپس مجدداً کمیت و کیفیت آن بررسی گردید.

[1] Specific Primers

[2] Rapid Amplification of cDNA Ends
[3] Total RNA
[4] Trizol reagent

جهت تکثیر توالی اسید نوکلئیک، بین یک قطعه مشخص از ژن و انتهای ناشناخته '3 و یا '5 از روی رشته RNAی پیک[1] از سیستم RACE (شامل3'RACE (جهت شناسایی توالی انتهای'3 cDNA) و 5'RACE (جهت شناسایی توالی انتهای'5 cDNA)) استفاده گردید و کلیه مراحل طبق دستورالعمل کیت RACE (شرکت Invitrogen) انجام شد. قطعات cDNAی تکثیر شده در 3'RACE و 5'RACE به‌منظور تعیین توالی، در ناقل pGEM-T Easy Vector (شرکت Promega) وارد و در باکتری DH5α همسانه سازی شدند. پلاسمیدها طبق دستورالعمل کیت (شرکت Bioneer) استخراج شدند و برای اطمینان از حضور قطعات وارد شده در ناقل، برش آنزیمی با آنزیم *Eco*RI (شرکت Roche) صورت گرفت و روی ژل آگاروز الکتروفورز بررسی شدند. تعیین توالی توسط شرکت شرکت ماکرو ژن انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج تعیین توالی در سطح نوکلئوتید و اسید آمینه

نتایج توالی یابی با نرم افزار Clustal W همردیف شدند و اعضای خانواده ژنی چالکون سنتاز گیاه خارمریم شناسایی گردیدند و با استفاده از نرم افزار DNASTAR، قالب باز خواندنی مشخص و توالی اسید آمینه آن پیش بینی شد. درصد تشابه در سطح نوکلئوتید و پروتئین بین قطعات ژنی چالکون سنتاز و cDNA آن در گیاه خارمریم با گیاهان هم خانواده آن (آستراسه) با نرم افزار GeneDoc برآورد و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها با روش UPGMA توسط نرم افزار MEGA4 ترسیم شد. موتیف‌های عملکردی توالی اسید آمینه چالکون سنتاز با استفاده از پایگاه داده‌های Prodom، Pfam و Prosite تعیین گردید.

نتایج

تکثیر و همسانه سازی قطعات ژنی مربوط به چالکون سنتاز گیاه خارمریم

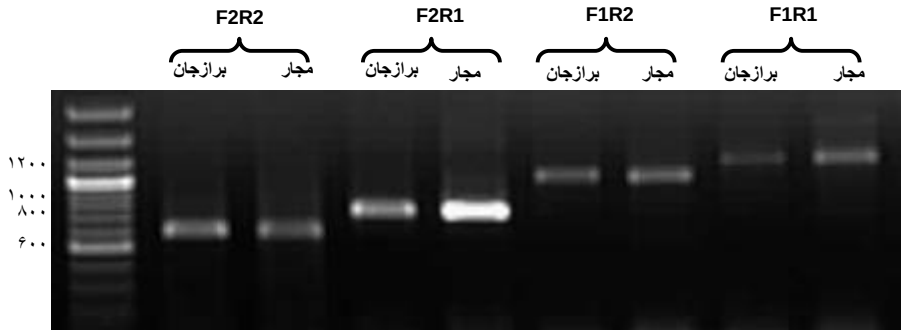
جفت آغازگرهای دژنره‌ی F1R1، F1R2، F2R1 و F2R2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی DNA ژنومی، موفق به تکثیر قطعات ژنی با اندازه مورد انتظار بر اساس توالی ژن چالکون سنتاز در سایر گیاهان (به ترتیب با اندازه 747 bp، 592 bp، 1016 bp و 861 bp) شدند. با توجه به این‌که محل حفظ شده اینترون بین آغازگر F1 و F2 است بنابراین جفت آغازگرهای F1R1 و F1R2 در PCR قادر به تکثیر قطعه اینترونی این خانواده ژنی بودند و باندهای تکثیر شده از این جفت آغازگرها، با اندازه مورد انتظار به همراه قطعه اینترونی همخوانی داشت (شکل 2). قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای F2R1 و F1R2 همسانه‌سازی و تعیین توالی شدند. توالی نوکلئوتیدی حاصل از این دو جفت آغازگر با یکدیگر مطابق نبودند و هر یک موفق به تکثیر یکی از اعضای خانواده ژنی چالکون سنتاز شده بودند.

[1] Messenger RNA

جدول 2- مشخصات آغازگرهای طراحی شده.

Table 2- Details of designed primers.

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence	دمای ذوب Melting tempreture	درصد GC [%]
Degenerate Forward Primer1 (F1)	GYGTHTAYCAAGCBGATTATCC	55-66.4°C	48.9
Degenerate Forward Primer2 (F2)	CCMAAATCMAARATCACCCACC	52.4-64.8°C	50.3
Degenerate Reverse Primer1 (R1)	ACCCCANTCYAAMCCTTCWCCG	64.9-72.4°C	48.5
Degenerate Reverse Primer2 (R2)	GYTTRARCTCMACCTGRTCCAG	54.3-69.2°C	51.4
Member1 Specific Forward Primer 1 (CHS1 F1)	TTCTCGTGTTCTTGTG	46	43.8
Member1 Specific Reverse Primer 1 (CHS1 R1)	GTTCTTTGAAATCAAC	42	31.2
Member1 Specific Forward Primer 2 (CHS1 F2)	AGGGTTCTCGTGTTCTTGTG	60	50
Member1 Specific Reverse Primer 2 (CHS1 R2)	CCTCTGAGTCTGGTAAGATGG	64	52.4
Member1 Specific Forward Primer 3 (CHS1 F3)	CCTGACTTGAAGACAGAGAGG	64	52.4
Member1 Specific Reverse Primer 3 (CHS1 R3)	GGAAAGTAACCGCTGTGATC	60	50
Member2 Specific Forward Primer 1 (CHS2 F1)	TTGTTTGCTCAGAAAG	44	37.5
Member2 Specific Reverse Primer 1 (CHS2 R1)	AGTAAGTTCCAATCAC	44	37.5
Member2 Specific Forward Primer 2(CHS2 F2)	ATGTACCAACAAGGGTGCTCG	64	52.4
Member2 Specific Reverse Primer 2 (CHS2 R2)	CCTTCCTCCCTCAAGTGTAAC	64	52.4
Member2 Specific Forward Primer 3 (CHS2 F3)	GGTTCAGACCCTGAGTTCTCC	66	57.1
Member2 Specific Reverse Primer 3 (CHS2 R3)	ACGAGTGAGTCAAGATGGTTC	62	47.6



شکل 2- ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن چالکون سنتاز با استفاده از 4 جفت آغازگر دژنره.

Figure 2- Gel electrophoresis of Chalcone synthase gene PCR products by 4 degenerate primers.

در نتیجه دو عضو از این خانواده (به نام-های *SmCHS1* و *SmCHS2* به‌ترتیب از روی توالی نوکلئوتیدی حاصل از جفت آغازگرهای F1R2 و F2R1) در گیاه خارمریم شناسایی شدند. علاوه براین، توالی حاصل در رقم مجار و ژنوتیپ بومی منطقه برازجان به ترتیب 99% و 98 % تشابه در سطح نوکلئوتید نشان دادند. بنابراین جهت مقرون به‌صرفه بودن، ادامه پژوهش فقط با رقم مجار ادامه یافت.

اندازه باند تکثیر شده برای عضو 1و 2 در 3'RACE با اندازه باندهای مورد انتظار (به ترتیب با اندازه 950 bp و 863 bp) مطابقت داشت. اما عضو 2 دارای یک باند دیگر با اندازه 600 bp نیز بود که حاکی از تکثیر احتمالی یک عضو دیگر از خانواده ژنی چالکون سنتاز در گیاه خار مریم است (شکل 3 الف). اندازه باندهای تکثیر شده در عضو 1 در 5'RACE و PCR آشیانه‌ای مربوطه، با اندازه باندهای مورد انتظار (با اندازه 779 bp و 621 bp) مطابقت داشت (لازم به ذکر است در مورد قطعه حاصل از 5'RACE به دلیل اتصال آداپتور و آغازگرهای کلی[1] به توالی چالکون سنتاز، باند تکثیر شده قدری طویل‌تر شده و روی ژل بالاتر ایستاده است). اما قطعه تکثیر شده‌ای در مورد عضو 2 مشاهده نشد (شکل3 ب).

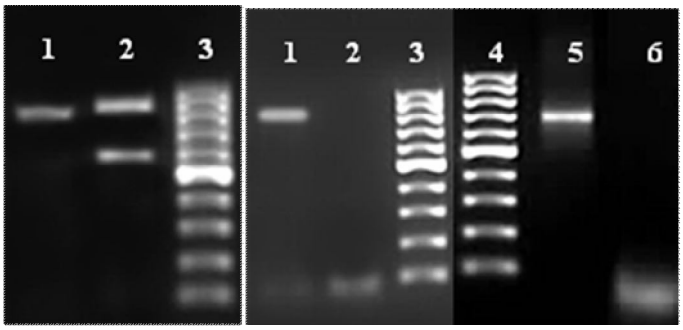
بررسی توالی قطعات ژنی، cDNA مربوط به چالکون سنتاز گیاه خارمریم و پیش بینی توالی اسید آمینه و موتیف‌های آن

بررسی توالی‌های به دست آمده روشن ساخت که ژن چالکون سنتاز در گیاه خار مریم همانند اغلب گیاهان مورد مطالعه، دارای دو اگزون و یک اینترون (208 bp) آن هم در مکان کاملاً حفظ شده است.

قطعات حاصل از تکثیر جفت آغازگرهای F1R2 (*SmCHS1*) و F2R1 (*SmCHS2*) در رقم مجار و ژنوتیپ بومی منطقه برازجان به ترتیب 99% و 98% تشابه در سطح نوکلئوتید و 99% و 97% تشابه در سطح پروتئین نشان دادند. مقایسه میان توالی نوکلئوتیدی و همچنین توالی اسیدآمینه پیش بینی شده حاصل از جفت آغازگرهای F1R2 و F2R1 در رقم مجار و ژنوتیپ بومی منطقه برازجان (دو عضو شناسایی شده و نامگذاری شده تحت عنوان *SmCHS1* و *SmCHS2*) به ترتیب حاکی از 73% و 70% تشابه بود.

توالی کامل cDNAی ژن چالکون سنتاز یک عضو از خانواده ژنی گیاه خارمریم از همپوشانی 5'RACE و 3'RACE عضو 1 به‌دست آمد. این توالی دارای 1406 باز است که اگزون یک و اگزون دو به ترتیب شامل 190 باز و 1049 باز می‌باشند. قالب باز خواندنی آن، 1239 باز است که 412 اسید آمینه را رمز می‌کند که اگزون یک و اگزون دو به ترتیب 63 و 349 اسیدآمینه را رمز می‌کنند.

[1] Universal primers



ب B الف A

شکل 3- ژل الکتروفورز RACE . الف- 3'RACE: 1) قطعه تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای CHS1F2 و AUAP درعضو1، 2) قطعه تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای CHS2F2 و AUAP درعضو 2 ،3) مارکر وزن مولکولی DNA100 bp. ب- 5'RACE: 1) قطعه تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای CHS1R2 و AAP در عضو 1، 2) قطعه تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای CHS2R2 و AAP در عضو 2، 4 و3) مارکر وزن مولکولی DNA100 bp، 5) محصول PCR آشیانه‌ای توسط جفت آغازگرهای CHS1R3 و AAP در عضو 1، 6) محصول PCR آشیانه‌ای توسط جفت آغازگرهای CHS2R3 و AAP در عضو2.

Figure 3- Gel electrophoresis of RACE. A- 3'RACE: 1) amplified fragment by CHS1F2 and AUAP primers in member 1, 2) amplified fragments by CHS2F2 and AUAP primers in member 2, 3) DNA100 bp molecular marker. B- 5' RACE: 1) amplified fragment by CHS1R2 and AAP primers in member 1, 2) amplified fragments by CHS2R2 and AAP primers in member 2, 3 and 4) DNA100 bp molecular marker, 5) nested PCR product by CHS1R3 and AAP in member 1, 6) nested PCR product by CHS2R3 and AAP in member 2.

نتایج همردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده و توالی‌های اسیدآمینه‌ای پیش بینی شده مربوطه نشان داد که دو قطعه cDNAی تکثیر شده (با اندازه‌های 968 bp و 614 bp) توسط آغازگرهای عمومی برگشتی و آغازگر اختصاصی رو به جلوی عضو دو در 3'RACE در سطح نوکلئوتید، 43% تشابه دارند و این قطعات همچنین با قطعات تکثیر شده از روی DNA توسط جفت آغازگرهای F2R1 (*SmCHS2*) و F1R2 (*SmCHS1*) نیز دارای تنوع بسیاری بودند. cDNAی ژن چالکون سنتاز در نواحی همپوشان در سطح نوکلئوتید با قطعه تکثیر شده از روی DNAی ژنومی توسط جفت آغازگرهای F1R2 (*SmCHS1*) و F2R1 (*SmCHS2*) به ترتیب 98% و 73 % تشابه نشان دادند. تعداد نوکلئوتیدها، اسیدآمینه‌های همپوشان و درصد تشابه آنان در سه عضو چالکون سنتاز گیاه خارمریم با ژن و اسیدآمینه‌های چالکون

سنتاز تیره آستراسه در جدول 3 نشان داده شده است. cDNAی ژن چالکون سنتاز در گیاه خارمریم بیشترین تشابه را در ناحیه رمز شونده نوکلئوتیدی به ترتیب با cDNAهای ژن چالکون سنتاز *Callistephus chinensis* (81%)، 2 *Gerbera hybrida* (80%)، *Chrysanthemum x morifolium* (80%) و 1 *Gerbera hybrida* (76%) نشان داد (جدول 3) و چون این چهار توالی از میان گیاهان تیره آستراسه کامل بودند، ترسیم درخت فقط با استفاده از آنها انجام شد (شکل4 الف). نتایج حاصل از همردیفی‌ها نشان داد که توالی‌های اسید آمینه‌ای پیش بینی شده از روی DNAی ژنومی تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای دژنره F1R2 (*SmCHS1*)، F2R1 (*SmCHS2*) و همچنین توالی کامل cDNAی (*SmCHS3*) به دست آمده در گیاه خارمریم مربوط به آنزیم چالکون سنتاز می باشند. توالی‌های اسید آمینه‌ای پیش بینی شده از روی cDNAی ژن چالکون سنتاز (*SmCHS3*) و قطعه تکثیر شده از روی DNA ژنومی توسط جفت آغازگرهای F1R2 (*SmCHS1*) و F2R1 (*SmCHS2*) به ترتیب 98% و 71% تشابه درسطح پروتئین در نواحی همپوشان نشان دادند. توالی پروتئینی پیش بینی شده از روی cDNAی ژن چالکون سنتاز گیاه خارمریم (*SmCHS3*) بیشترین تشابه را به‌ترتیب با پروتئین چالکون سنتاز در گیاه *Chrysanthemum x morifolium* (88%)، *Callistephus chinensis* (88%)، 2 *hybrida Gerbera* (86%) و 1 *Gerbera hybrida* (83%) نشان داد (جدول 3 و شکل 4 ب).

توالی اسید آمینه چالکون سنتاز گیاه خار مریم دارای دومین‌های[1] پایانه N[2] و پایانه C[3] است که به‌ترتیب از اسید آمینه‌های شماره 5 و 242 آغاز و به اسید آمینه‌های شماره 232 و 392 ختم می‌شوند.

بحث

اکثر آنزیم‌های دخیل در متابولیسم ثانویه گیاهان، توسط خانواده‌های کوچک ژنی رمز می‌شوند که در اثر پدیده مضاعف شدگی در طی تکامل بوجود آمده‌اند (Durbin *et al*., 2000). آنزیم چالکون سنتاز نیز در بسیاری از گیاهان به غیر از آرابیدوپسیس توسط خانواده ژنی رمز می‌شود (Rhonda *et al*., 1988). اختلاف میان اعضای خانواده ژنی چالکون سنتاز ممکن است بر اساس تفاوت در سطح نوکلئوتید، اندازه اینترون و یا ناحیه ترجمه نشده 3'[4] در mRNA باشد (Durbin *et al*., 2000). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آنزیم چالکون سنتاز گیاه خارمریم مانند سایر گیاهان توسط خانواده ژنی (داری حداقل سه عضو) به شرح ذیل رمز می‌شود:

1- چالکون سنتاز 1 گیاه خار مریم (*SmCHS1*): که قطعه‌ای از آن به طول 1069 باز توسط جفت آغازگرهای دژنره F1R2 از روی

[1] Domains
[2] N-terminal domain
[3] C-terminal domain
[4] Untranslated region (UTR)

DNAی ژنومی تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین توالی شد که یک اینترون 208 بازی را نیز شامل می‌شود (با شماره دست یابی JN182805 در پایگاه NCBI ثبت شد).

2- چالکون سنتاز 2 گیاه خار مریم (*SmCHS2*): که قطعه‌ای از آن با اندازه 747 بازی توسط جفت آغازگرهای دژنره F2R1 از روی DNAی ژنومی تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین توالی شد (با شماره دست یابی JN182807 در پایگاه NCBI ثبت شد).

3- چالکون سنتاز 3 گیاه خار مریم (*SmCHS3*): توالی کامل cDNAی این ژن با اندازه 1406 باز توسط آغازگرهای اختصاصی عضو یک و آغازگرهای کلی از روی RNA در سیستم‌های 3'RACE و 5'RACE تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین توالی شد (با شماره دست یابی JN182806 در پایگاه NCBI ثبت شد). در این ژن اگزون یک و اگزون دو به ترتیب شامل 190 باز و 1049 باز می‌باشند. قالب باز خواندنی آن 1239 باز است که کدون آغازین (ATG) در مکان 35+ و کدون پایانی (UGA) در مکان1271 + قرار دارد و 412 اسید آمینه را رمز می‌کند. اگزون یک و اگزون دو به ترتیب 63 و 349 اسید آمینه را رمز می‌کنند.

همردیفی توالی کامل cDNA ی ژن چالکون سنتاز (*SmCHS3*) و قطعه تکثیر شده از روی DNA توسط جفت آغازگرهای F1R2 (*SmCHS1*) نشان داد که مکان اینترون مانند سایر گیاهان کاملاً حفظ شده است. همردیفی توالی چالکون سنتاز گیاه خارمریم با سایر گیاهان در سطح نوکلئوتیدی و اسید آمینه نشان می‌دهد که این توالی‌ها در طی تکامل بسیار حفظ شده هستند که خود دال بر اهمیت و کلیدی بودن آنزیم چالکون سنتاز در مسیر سنتز فلاونوئیدها می‌باشد.

شایان ذکر است که انجام آزمایشات تکمیلی از جمله یافتن توالی ابتدا و انتهای چالکون سنتاز 1 و 2 و شناسایی توالی‌های اینترونی چالکون سنتاز 2 و 3 گیاه خار مریم، آزمون لکه گذاری سادرن برای تشخیص تعداد نسخه‌های ژنی چالکون سنتاز در ژنوم این گیاه و بررسی الگوی بیان خانواده ژنی چالکون سنتاز گیاه خار مریم در اندام‌ها، مراحل نموی و تنش-های مختلف زیستی و غیر زیستی گام‌های مؤثر بعدی در شناخت بهتر اعضای این خانواده در گیاه خار مریم و مهندسی متابولوم آن به منظور افزایش تولید سیلیمارین خواهد بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را از مدیریت محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به دلیل فراهم آوردن امکانات مالی و اجرایی این پروژه (شماره مصوب: 12-05-05-870287004) ابراز می‌دارند.

جدول 3- تعداد نوکلئوتیدها، اسیدآمینه‌های همپوشان و درصد تشابه آن‌ها میان سه عضو چالکون سنتاز گیاه خارمریم و تیره آستراسه. الف- تعداد نوکلئوتیدهای همپوشان و درصد تشابه آن‌ها، ب- تعداد اسیدآمینه‌های همپوشان و درصد تشابه آن‌ها (فقط توالی ژنی و اسیدآمینه‌ای گیاهان *Gerbera hybrida*، *Callistephus chinensis*، *Chrysanthemum x morifolium* کامل بوده و در ترسیم درخت شرکت یافتند).

الف (A)

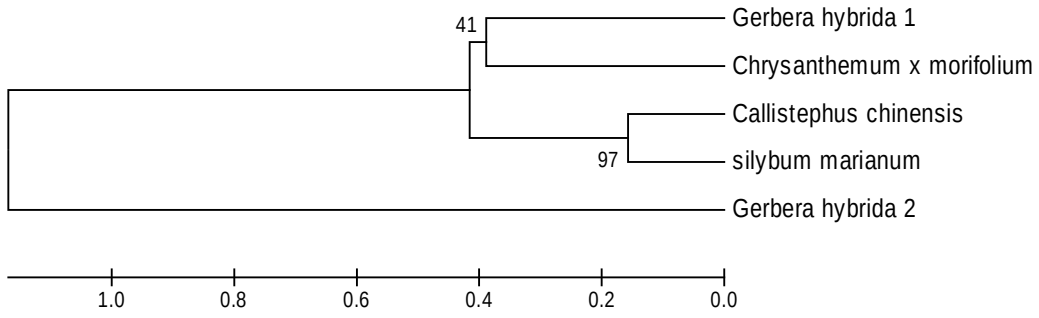
نام توالی ژنی چالکون سنتاز Chalcone synthase gene names	*SmCHS1* (*F1R2*)		*SmCHS2* (*F2R1*)		*SmCHS3 (Silybum marianum)*	
	تعداد نوکلئوتید همپوشان Numbers of covered BPs	درصد تشابه Similarity %	تعداد نوکلئوتید همپوشان Numbers of covered BPs	درصد تشابه Similarity %	تعداد نوکلئوتید همپوشان Numbers of covered BPs	درصد تشابه Similarity%
SmCS1 (861 bps)						
SmCS2 (747 bps)	592	73				
SmCS3 (1406 bps)	861	98	747	73		
Gerbera *hybrida* 1 (1381 bps)	861	79	747	73	All	76
Gerbera hybrida 2 (1428 bps)	861	83	747	71	All	80
Callistephus chinensis (1419 bps)	861	84	747	72	All	81
Chrysanthemum x morifolium (1416 bps)	861	83	747	72	All	80
Chrysanthemum indicum (828 bps)	667	79	747	72	837	79
Chrysanthemum vestitum (828 bps)	667	79	747	72	837	79
Chrysanthemum lavandulifolium(828bps)	667	79	747	72	837	79
Chrysanthemum nankingense (828 bps)	667	78	747	71	837	78
Helianthus annuus (1336 bps)	848	70	747	62	1311	64
Petasites fragrans (515 bps)	515	83	515	69	515	83

ب (B)

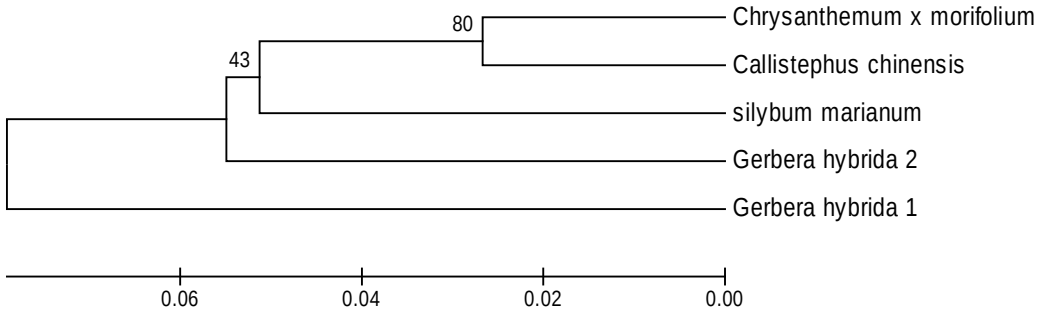
نام توالی اسید آمینه‌ای چالکون سنتاز Chalcone synthase protein names	SmCHS1 (*F1R2*)		SmCHS2 (F2R1)		SmCHS3 *(Silybum marianum)*	
	تعداد اسیدآمینه همپوشان Numbers of covered Amino acid	درصد تشابه Similarity %	تعداد اسیدآمینه همپوشان Numbers of covered Amino acid	درصد تشابه Similarity %	تعداد اسیدآمینه همپوشان Numbers of covered Amino acid	درصد تشابه Similarity %
SmCHS1 (286 aa)						
SmCHS2 (249 aa)	197	70				
SmCHS3 (412 aa)	286	98	249	71		
Gerbera *hybrida* 1 (403 aa)	286	90	249	71	All	83
Gerbera hybrida 2 (398 aa)	286	90	249	71	All	86
Callistephus chinensis(398 aa)	286	94	249	72	All	88
Chrysanthemum x morifolium (397 aa)	286	93	249	73	All	88
Chrysanthemum indicum (276 aa)	222	90	249	70	279	89
Chrysanthemum vestitum (276 aa)	222	91	249	70	279	90
Chrysanthemum lavandulifolium (276 aa)	222	91	249	69	279	89
Chrysanthemum nankingense (276 aa)	222	90	249	69	279	89
Helianthus annuus (368 aa)	283	83	249	66	368	73
Petasites fragrans (171 aa)	171	94	171	71	171	93

Table 3- Numbers of covered nucleotide, amino acid and similarity percent between 3 members of *silybum marianum* chalcone synthase and asteraceae Family. A- numbers of covered nucleotide and similarity, B- numbers of covered amino acid and similarity (only *Gerbera hybrida, Callistephus chinensis* and *Chrysanthemum x morifolium* had complete gene and amino acid sequences therefore they used to draw trees).

الف (A)



ب (B)



شکل 4- الف- درخت فیلوژنتیکی ژن چالکون سنتاز در تیره آستراسه (Gerbera hybrida 1 و Gerbera hybrida 2 اعضای مختلف ژن چالکون سنتاز در این گیاه می‌باشند.) ب- درخت فیلوژنتیکی پروتئین چالکون سنتاز در تیره آستراسه

Figure 4- A- Phylogenetic tree of chalcone synthase gene in asteraceae (Gerbera hybrida 1 and 2 are different member of chalcone synthase in this plant). B- Phylogenetic tree of chalcone synthase protein in asteraceae.

منابع

Bourgand F, Gravot A, Milesi S, Gonteir E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perpective. Plant Science 161: 839-851.

Durbin ML, Mccaig B, Clegg M T (2000). Molecular evolution of the Chalcone synthase multi genefamily in the Morning glorygenome. Plant Molecular Biology 42: 79–92.

Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP (1999). Structure of Chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. Nature Structural and Biology 6: 775-784.

Fliegman J, Schroder G, Schanz S, Britsch L, Schroder J (1992). Molecular analysis of Chalcone and dihydropinosylvin synthase from scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. Plant Molecular Biology 18: 489-503.

Hasanloo T, Khavari-nejad RA, Majidi E, Shams-Ardakani MR(2005). Analysis of flavonolignans in dried fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn from Iran. Pakistan Journal of Biological Sceince 8: 1778-1782.

Ji Y, Jinxia H, Hongya G,Yang Zh, Ziheng Y (2002). Duplication and adaptive evolution of Chalcone synthase genes of dendranthema (Asteraceae). Molecular Biology and Evolution 19: 1752-1759.

Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. BioEssays 16: 123-132.

Kubasek W L, Shirley BW, Mckillop A, Goodman H M, Briggs W, Ausber FA (1992). Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating Arabidopsis seedlings. The Plant Cell 4: 1229-1239.

Lanz T, Tropf S, Marner FJ, Schoroder J, Schroder G (1991). The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and Chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. Biological Chemistry 266: 9971-9976.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

Narayana KR, Sripal R, Chaluvadi MR, Krishan DR (2001). Bioflavonoids Classification, Pharmalogical, Biochemical effects and Therapeutic potential. India Journal of Pharmacology 33: 2-6.

Niesbach-Klosgen U, Barzen E, Bernhardt J, Rohde W, Schwarz-Sommer Z, Reif HJ, Wienand U, Saedler H (1987). Chalcone synthase genes in plants:a tool to study evolutionary relationships. Evolution 26: 213-225.

Rhonda L, Feinbaum M, Frederick M (1988). Transcriptional Regulation of the *Arabidopsis thaliana* Chalcone Synthase Gene. Molecular and Cellular Biology 5: 1985-1992.

Schonfeld JV, Weisbrod B, Muller MK (1997). Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties protects exocrine pancreas from cyclosporine toxicity. Cellular and molecular life sciences 53: 917-920.

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

Identification and cloning of chalcone synthase gene family in milk thistle (*Silybum marianum* L.) plant

Sanjari S.[1], Shobbar Z.S.[2*], Ebrahimi M.[3], Hasanloo T.[2], Sadat Noori S.A.[4]

[1] MSc graduated from Plant Breeding, Agronomy and Plant Breeding Department, Abouraihan Campus, University of Tehran. Pakdasht, Tehran, Iran.
[2] Assistant Professor of Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. Mahdasht Road, Karaj, Alborz, Iran.
[3] Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, Abouraihan Campus, University of Tehran. Pakdasht, Tehran, Iran.
[4] Associate Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, Abouraihan Campus, University of Tehran[4]. Pakdasht, Tehran, Iran.

Abstract

Silymarin is a flavonoid compound derived from milk thistle plant (*Silybum marianum*) seeds comprising several pharmacological applications. chalcone synthase (*CHS*) is a key enzyme in the biosynthesis of flavonoids, thereby identification of *CHS* gene in milk thistle plant can be of great importance. Seeking that, the available sequences of *CHS* genes from different plants collected, aligned and the conserved regions detected. Then, 4 degenerate primers designed based on the *CHS* consensus sequences. The fragments of *CHS* genes from Borazjan's native genotype and Majar's modified genotype were amplified by polymerase chain reaction and then, cloned and sequenced. Analysis of the resultant nucleotide and deduced amino acid sequences lead to identification of two different members of *CHS* gene family from *Silybum marianum*. 6 specific primers were designed based on the diverged regions of each member for amplification of related cDNA from majar's total RNA in the RACE system. Amplified fragment of cDNA in 3'RACE and 5'RACE were cloned and sequenced. Full length cDNA was identified by overlapping the 3'RACE and 5'RACE sequences of member 1 whose open reading frame contains 1239 bp including exon 1 (190 bp) and exon 2 (1049 bp) encoding 63 and 349 amino acid residues, respectively. Altogether, analysis of the resulting nucleotide and deduced amino acid sequences lead to identification of three different members of chalcone synthase from *Silybum marianum* containing the conserved chalcone synthase C-terminal and N-terminal domains.

Key words: *Chalcone synthase, Silybum marianum, Cloning, RACE, Sequencing.*

* Corresponding Author: Shobbar Z.S. Tel: +98 261 270 3536 Email: shobbar@abrii.ac.ir