

Cloning, sequencing and expression analysis of *C4H* gene in *Ferula pseudalliacea*

Pegah Shahidi¹, Yavar Vafae^{*2}, Bahman Bahramnejad^{*3}, Dara Dastan⁴

1. M.Sc. Graduate, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
E-mail: shahidi.pegah@gmail.com
2. Corresponding Author, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
and Medicinal Plants Breeding and Development Research Institute, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
E-mail: y.vafae@uok.ac.ir
3. Corresponding Author, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
E-mail: b.bahramnejad.uok.ac.ir
4. Dept. of Farmacognosy, Faculty of School of Pharmacy, Hamedan Medical University, Hamedan, Iran.
E-mail: d.dastan@umsha.ac.ir

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 07.11.2021

Revised: 07.19.2021

Accepted: 08.04.2021

Keywords:

Alignment,
Apiaceae,
Phylogeny,
Transcription

ABSTRACT

Background and Objectives: *Ferula pseudalliacea* is a perennial and monocarpic plant species belonging to Apiaceae family. This species is distributed from Middle Asia to Northern Europe. The main secondary metabolites present in *Ferula* genus comprise coumarins, sesquiterpene coumarins and di-sesquiterpene coumarins. Phenylpropanoid pathway is mainly responsible for biosynthesis of these valuable phytochemicals. Cynamate-4-hydroxylase (*C4H*) is one of the main and key enzyme in phenylpropanoid pathway. Therefore, there is no genomic or transcriptomic information in *Ferula pseudalliacea* and as the first report, we aimed to clone and sequence *C4H* and its expression analysis in root, stem, leaf, inflorescence and immature seed in this valuable medicinal plant species.

Materials and Methods: Different organs of *F. pseudalliacea* were collected from Gazne village near Sanandaj city in June 2019. RNA was extracted from collected organs using LiCl method. cDNA was synthesized using Yekta Tajihz Azmia kit in 20 μ l reactions. PCR products amplified with primer designed from conserved regions of *C4H* among apiaceous species and it was then cloned within pTG19. The verified recombinant plasmid were send for Applied Biosystem company for sequencing. To confirm and asses the expression of *C4H*, both Real-Time PCR and semi-quantitative PCR were employed. The phylogenetic tree of *C4H* was obtained using Omega software based on the Neighbor-Joining method with bootstrap 1000 for amino acid sequence.

Results: The obtained sequences from *C4H* clones was aligned and verified using BlastX. In the resulted dendrogram, *C4H* sequence from *F. pseudalliacea* was grouped with *C4H* gene from other species within Apiaceae family showing their clos relationship. The highest sequence identity was observed with *C4H* from *Daucus carota* which was fallen in same cluster with *C4H* from *F. pseudalliacea*. It is shown that *C4H* has 7 motifs one of this motifs belongs to conserved motif cytochrome-cysteine 450 with FGVGRRSCPG sequence.

Conclusion: As the seconf most important gene in phenylpropanoid biosynthetic pathway, *C4H* plays an undeniable role in production of

phenolic phytochemicals in particular in inflorescence which had the highest *C4H* expression rate. Studies performed on the *C4H* expression in other species revealed a specific action of *C4H* in biosynthesis of special secondary metabolites in specific tissue. As the phenolic compounds encompass a diverse range of secondary metabolites in forms of volatile and extracts, further investigations are needed to understand the exact role of *C4H* enzyme. Moreover, the identified gene sequence can be used in production of recombinant constituents in other species which have the corresponding precursors.

Cite this article: Shahidi, Pegah, Vafaei, Yavar, Bahramnejad, Bahman, Dastan, Dara. 2022. Cloning, sequencing and expression analysis of *C4H* gene in *Ferula pseudalliacea*. *Journal of Plant Production Research*, 29 (3), 35-48.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JOPP.2021.19308.2849

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

همسانه‌سازی، توالی‌یابی و بررسی بیان ژن *C4H* در آنغوزه تلخ *Ferula pseudalliacea*

پگاه شهیدی^۱، یاور وفايي^{۲*}، بهمن بهرام‌نژاد^{۳*}، دارا دستان^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: shahidi.pegah@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران و مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: y.vafae@uok.ac.ir
۳. نویسنده مسئول، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: b.bahramnejad.uok.ac.ir
۴. گروه فارماکوجنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. رایانامه: d.dastan@umsha.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی	سابقه و هدف: آنغوزه تلخ <i>Ferula pseudalliacea</i> گیاهی از خانواده چتریان، چند ساله و مونوکاریپیک می‌باشد. رویشگاه این گیاه آسیای مرکزی تا نوار شمالی اروپا می‌باشد. ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده متابولیت‌های ثانویه این جنس شامل کومارین‌ها، سزکوئی‌ترین کومارین‌ها و دی‌سزکوئی‌ترین کومارین‌ها می‌باشد. مسیر اصلی بیوسنتز ترکیبات مؤثر این گیاه مسیر فنیل پروپانوئید است. یکی از آنزیم‌های اصلی و کلیدی این مسیر سینامات-۴-هیدروکسی‌لیاز است. هیچ اطلاعات ژنومی از ژن‌های این گیاه دارویی با ارزش وجود ندارد. بنابراین در گزارش حاضر، همسانه و توالی‌یابی ژن <i>C4H</i> و میزان بیان آن در ریشه، ساقه، برگ، گل آذین و بذر نارس آنغوزه تلخ مورد بررسی قرار گرفت.
واژه‌های کلیدی: چتریان، رونویسی، فیلوژنی، همردیفی	مواد و روش‌ها: قسمت‌های مختلف گیاه <i>Ferula pseudalliacea</i> در اوایل خردادماه از جنوب شرقی روستای گزنه در ۲۰ کیلومتری سنندج جمع‌آوری گردید. استخراج RNA از بافت‌های مختلف گیاه <i>Ferula pseudalliacea</i> با روش لیتیم کلرید انجام گرفت. جهت ساخت cDNA، از کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیز در حجم ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. محصول پی سی آر با استفاده از آغازگر طراحی شده از نواحی حفاظت شده ژن <i>C4H</i> ، درون ناقل pTG19 همسانه شد. نمونه‌های پلاسمید نوترکیب بعد از تأیید مولکولی، جهت تعیین توالی به شرکت آپلاید بیوسیستم ارسال شد. جهت ارزیابی میزان بیان ژن <i>C4H</i> از دو روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی و روش نیمه کمی استفاده شد. دندروگرام داده‌های به دست آمده از توالی‌یابی هر ژن، با استفاده از نرم‌افزار مگا با روش آماری اتصال همسایگی با میزان بوت سترپ برای توالی پروتئینی رسم شد.

یافته‌ها: توالی‌های به دست آمده از کلون‌های ژن *C4H* در پایگاه داده ان سی بی آی با استفاده از BlastX هم‌ردیف شد و با توجه به نتیجه بلاست، توالی‌های دو ژن ذکر شده تأیید گردید. این ژن با ژن‌های *C4H* سایر گیاهان هم‌خانواده خود در یک گروه قرار گرفت. این ژن بالاترین تشابه را در هر دو سطح توالی نوکلئوتیدی و پروتئین با ژن *C4H* هویج نشان داد که با هم در یک زیر گروه قرار گرفتند. ژن *C4H* دارای ۷ موتیف بوده که موتیف حفظ شده سیتوکروم سیستئین P450 با توالی FGVGRRSCPG در خانواده سیتوکروم P450 جز آن‌ها می‌باشد. بررسی بیان ژن با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی بالاترین سطح رونویسی را در گل‌آذین و کم‌ترین میزان بیان را در برگ نشان داد.

نتیجه‌گیری: *C4H* به عنوان دومین ژن کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید نقش انکارناپذیر در تولید ترکیبات فنلی در بافت‌های ویژه همانند گل‌آذین که بیش‌ترین میزان بیان را نشان داد، دارد. سایر پژوهش‌های انجام شده در گیاهان مختلف در زمینه بیان ژن *C4H* نشان از اختصاصی عمل کردن در تولید ترکیب‌های خاص، در بافت خاصی بوده است. با توجه به این‌که ترکیبات فنلی دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را به صورت مواد فرار (اسانس) و عصاره شامل می‌شود برای پی بردن به نقش دقیق آنزیم *C4H* در اندام‌های مختلف نیاز به پژوهش بیش‌تر می‌باشد. با توجه به نقش انکارناپذیر ژن *C4H* در بیوسنتز بسیار از ترکیبات با ارزش دارویی، از توالی شناسایی شده می‌توان در تولید ترکیبات نو ترکیب در سایر گونه‌های گیاهی که پیش‌ماده‌های مورد نظر را دارند، استفاده نمود.

استناد: شهیدی، پگاه، وفایی، یاور، بهرام‌نژاد، بهمن، دستان، دارا (۱۴۰۱). هم‌سانه‌سازی، توالی‌یابی و بررسی بیان ژن *C4H* در آنگوزه تلخ *Ferula pseudalliacea*. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۹ (۳)، ۳۵-۴۸.

DOI: 10.22069/JOPP.2021.19308.2849



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

خانواده چتریان با بیش از ۴۵۵ جنس و ۳۶۰۰ تا ۳۷۸۰ گونه از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی جهان محسوب می‌شود (۱). بسیاری از آن‌ها به دلیل داشتن ترکیبات زیست‌فعال از جمله فلاونولها، سزکوئی‌ترینها، کومارینها، تری‌ترپنوئیدها، ترکیبات روغنی و اسیدهای چرب مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲، ۳). جنس *Ferula* عنوان بزرگ‌ترین جنس خانواده چتریان در آسیا و سومین جنس این تیره در دنیا را به خود اختصاص داده است و دارای حدود ۱۸۰ گونه می‌باشد که بیش‌تر در آسیای مرکزی و خاورمیانه و شمال اروپا رشد می‌کنند (۴). حدود ۳۰ گونه از این جنس بومی ایران بوده و در مناطق مختلف استان خراسان،

بلوچستان، نواحی جنوبی ایران و هم‌چنین در نواحی مرکزی و شمال غرب می‌روید (۵). گونه‌های این جنس در اغلب مناطق به عنوان داروهای محلی توسط افراد بومی استفاده می‌شود. جنس *Ferula* در ایران بیش‌تر به نام کما، باریجه و آنغوزه شناخته می‌شود. آنغوزه به عنوان یکی از گونه‌های مهم دارویی و تجارتنی از تیره چتریان، گیاهی چندساله، منوکارپیک و بومی مدیترانه و مرکز آسیا است که دارای ترکیبات اسانسی و رزینی فراوان می‌باشد (۶). آنغوزه تلخ با نام علمی *F. pseudalliacea* یکی از گونه‌های کمیاب درون این جنس می‌باشد که در رویشگاه‌های ویژه در غرب ایران به ویژه استان کردستان رویش دارد (۷) (شکل ۱).



شکل ۱- ریخت‌شناسی گیاه *Ferula pseudalliacea*. الف: گیاه کامل، ب: برگ، ج: بذر.
Fig. 1. Morphology of *Ferula pseudalliacea*. A. Whole plant, B. Leaf, C. Seed.

کاتالیزور دارد (۸). ژن *C4H* عضو زیرخانواده *CYP73* از خانواده سیتوکروم *P450* (*CYP450*) می‌باشد (۹). ژن‌های خانواده *P450* در مسیرهای مختلف زیست-شیمیایی شرکت داشته و نتیجه فعالیت این

ژن *C4H* برای اولین بار در جوانه‌های رأسی گیاهچه نخودفرنگی شناسایی شد. این ژن کدکننده آنزیمی است که در تشکیل گروه‌های هیدروکسیل روی کربن شماره ۴ ترنس سینامیک اسید، نقش

به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به بافت آوندی ۳-۶ میانگرمه بیش‌تر بوده است (۱۵).

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: قسمت‌های مختلف گیاه آنگوزه تلخ *Ferula pseudallicea* شامل ریشه، ساقه، برگ، گل‌آذین و بذر نارس در اوایل خرداد ماه سال ۱۳۹۸ از جنوب شرقی روستای گزته در ۲۰ کیلومتری سنندج جمع‌آوری گردید و نمونه‌های جمع‌آوری شده در تانک ازت به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه اصلاح نباتات دانشگاه کردستان انتقال داده شد. نمونه‌ای از برگ و بذر نیز جهت تأیید سیستماتیک گونه به مرکز تحقیقات مرتع و آبخیزداری سنندج برده و تحت شماره MPH-1197 در هرباریوم مرکز تحقیقات منابع طبیعی نگهداری شد.

طراحی آغازگر: جهت طراحی آغازگر اختصاصی برای سینامیک ۴ هیدروکسی لیاز (*C4H*) به عنوان ژن‌های هدف و ژن آکتین به عنوان ژن مرجع از توالی سی DNA این ژن‌ها از گیاهان خانواده چتریان موجود در پایگاه اطلاعاتی داده ان‌سی‌بی‌آی^۱ استفاده شد. برای این هدف، توالی ژن *C4H* از گونه‌های خانواده چتریان شامل *Daucus carota*، *Petroselinum crispum*، *Ami majus* و *Angelica dahurica* از پایگاه ان‌سی‌بی‌آی دریافت شد. هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار تحت وب کلاستال اومگا^۲ انجام گردید و بعد از بررسی‌های لازم با استفاده از نرم‌افزار تحت وب پرایمر^۳، از ناحیه حفظ شده، آغازگرهای مورد نیاز طراحی شد. جهت بررسی ویژگی‌های آغازگرهای طراحی شده مانند دمای اتصال، ساختار ساقه-حلقه، سنجاق‌سری و دایمرها از نرم‌افزار آنالین لیگو آنالیزر^۴ استفاده گردید. بعد از طراحی و بررسی،

ژن‌ها تولید ترکیبات متنوعی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه است. بیش‌تر ژن‌های ساختاری در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها از اعضای این خانواده ژنی می‌باشند، مانند ژن‌های *C4H(CYP73)*، *F3'5'H(CYP75A)* و *IFS(CYP93C)* (۱۰). *C4H* نیز مانند ژن فنیل‌آلنین‌آمونیا‌لیاز یک خانواده ژنی بوده و تعداد اعضای آن در گیاهان مختلف متغیر می‌باشد. این ژن در آرآبیدوپسیس تنها دارای یک عضو می‌باشد (۱۱). *AtC4H* در تمام بافت‌ها بیان می‌شود و با توجه به آلودگی‌های قارچی، ایجاد زخم و تغییرات نور (UV) در مسیر فنیل‌پروپانوئید، کارکردهای متنوعی دارد (۱۲، ۱۳).

پژوهش انجام‌شده در مورد این ژن در گیاه پرتقال منجر به شناسایی دو ژن *C4H* (*C4H 1*, *C4H 2*) گردید. بررسی الگوی بیانی این دو ژن در محل زخم، بیانگر افزایش بیان ناشی از زخم بوده است. در این آزمایش ژن *C4H 2* حتی در نمونه‌های کنترل، ۱۰-۳ برابر بیش‌تر از ژن *C4H 1* بیان شده بود. تفاوت بیان این دو عضو از خانواده ژنی *C4H*، نشان‌دهنده کارکرد متفاوت آن‌ها در مسیر فنیل‌پروپانوئید است (۱۴).

در گیاه صنوبر این ژن نیز جداسازی و بررسی شده است. نتایج نشان دادند آنزیم *C4H* در *P. tremuloides* توسط چهار ژن و در *P. trichocarpa* توسط سه ژن کد می‌شود. تفاوت بیان این ژن‌ها در گیاه صنوبر گویای این می‌باشد که ایزوفرم‌های ژن *C4H* در گونه‌های مختلف این گیاه نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی را بازی می‌کنند. *PtreC4H2* در بافت آوند چوبی نسبت به *PtreC4H1* بیان بیش‌تری داشته است. در گونه *P. trichocarpa* دو ژن *PtriC4H1* و *PtriC4H2* الگوی بیانی متمایزی را نیز نشان دادند. *PtriC4H1* بیان قوی‌تری را در آوند چوبی که در مرحله رشد و نمو دارای ۳-۶ میانگرمه بوده نسبت به مرحله ۸-۱۵ میانگرمه‌ای داشته است در صورتی که سطح رونویسی *PtriC4H2* در بافت آوندی با میانگرمه بین ۸-۱۵

1- NCBI
2- Clustal Omega
3- Primer 3
4- Oligo analyzer

گردیدند. مشخصات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده است.

توالی آغازگرهای مورد نظر جهت ساخت به شرکت پیشگام ارسال شد. جهت بررسی بیان ژن‌های ذکر شده، بعد از توالی‌یابی، آغازگرها مجدداً طراحی

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت کلون‌سازی، سنتز cDNA و بررسی بیان ژن.

Table 1. Primer sequences and information used for cloning, cDNA synthesis and gene expression analysis.

طول قطعه تکثیر شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR product size (bp)	دمای اتصال Annealing temp	توالی آغازگر Primer sequence	نام آغازگر Primer name
890	56	GCCATCTATGATTGGGAATGG	ACTIN-F
		GCCACCACCTTGATCTTCATG	ACTIN-R
960	61	TCATGTTTGATAGAAGGTTTGAGAG	C4H-F
		GAAGTGTCTCTTTCTCTGCTG	C4H-R
-	60	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTT TTTTTTTTTTTTV	Oligo(dT)

محلول کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد و پس از ۲ دقیقه ورتکس، در شرایط قبلی سانتریفیوژ تکرار شد. بعد از برداشتن فاز روئی، یک سوم حجم آن لیتیم کلراید ۸ مولار اضافه و به مدت یک شب در فریزر دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها در ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز روئی حذف و رسوب تشکیل شده به مدت ۱۰ دقیقه با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. میکروتیوب‌ها دوباره در دمای ۴ درجه با ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از دور ریختن فاز روئی رسوب باقی مانده جهت خشک شدن به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در زیر هود قرار داده شد و در نهایت رسوب خشک شده در ۲۰-۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با دیس^۱ حل گردید. جهت حذف DNA، از آنزیم DNase I استفاده شد. ارزیابی کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده، با استفاده از

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با روش لیتیم کلراید (۱۶) با اندکی تغییر انجام گرفت. ابتدا ۰/۳ گرم از بافت مورد نظر وزن و در هاون با ازت مایع کاملاً پودر شد. سپس ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل تریس ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۵ میلی‌مولار، لیتیم کلراید ۸ مولار، SDS ۵ درصد و PVP ۲ درصد) به آن اضافه و کاملاً به‌طور کامل مخلوط شد. محتویات هاون به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری انتقال داده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. ۱ میلی‌لیتر محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل (۲۵:۲۴:۱) به میکروتیوب اضافه گردید و مجدداً ۳۰ ثانیه ورتکس شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه در ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به میکروتیوب جدید انتقال داده شد و هم حجم آن محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل اضافه شد، میکروتیوب‌ها به مدت ۲ دقیقه ورتکس و در شرایط قبلی سانتریفیوژ شدند. دوباره فاز روئی به میکروتیوب جدید انتقال داده شد، هم حجم آن

1- DEPC

کلنی-پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن و آغازگر یونیورسال ام ۱۳ انجام شد. سه نمونه پلاسمید نوترکیب بعد از تایید مولکولی جهت تعیین توالی به شرکت آپلاید بیوسیستم^۲ (آمریکا) از طریق شرکت فزایژه ارسال شد. به این منظور از DNA پلاسمید استخراج شده خالص با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد.

آنالیز فیلوژنتیکی، پیش‌بینی دمن‌ها و تحلیل بیان ژن: دندروگرام داده‌های به‌دست آمده از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار مگا نسخه ۶.۰۶ با روش آماری اتصال همسایگی^۳ با بوت استرپ^۴ ۱۰۰۰ در دو سطح نوکلئوتید و پروتئین رسم شد. برای تعیین جایگاه‌های عملکردی و دمن‌های موجود از دو نرم‌افزار آنالین اینتر پرواسکن آنالیز^۵ و موتیف سرچ آنالیز^۶ استفاده شد. بعد از به‌دست آمدن سی‌تی، داده‌های به‌دست آمده در اکسل وارد و با استفاده از فرمول‌های مربوطه، میزان بیان به دست آمد. جهت بررسی میزان بیان هر ژن، از روش مقایسه سی‌تی استفاده گردید (۱۷).

نتایج و بحث

توالی‌یابی، آنالیز فیلوژنی و بررسی کارکردی پروتئین پیش‌بینی شده: توالی‌های به دست آمده از کلون‌های ژن *C4H* در پایگاه داده ان‌سی‌بی‌آی با استفاده از BlastX هم‌ردیف شد و با توجه به نتیجه هم‌ردیفی، توالی‌های دو ژن ذکر شده تأیید گردید (جدول ۲). در بین ۱۰ توالی اول بیش‌ترین میزان تشابه *C4H* از گونه *F. pseudalliacea* با توالی ژن *C4H* از هویج *Daucus carota* و کم‌ترین تشابه با توالی ژن *C4H* از سنبل خطایی *Angelica dahurica*

دستگاه نانودراپ انجام شد. جهت سنتز cDNA، از کیت سنتز cdNA شرکت یکتا تجهیز در حجم ۲۰ میکرولیتر استفاده شد.

همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن *C4H*: تکثیر قطعات مورد نظر به منظور تعیین توالی ژن‌های هدف و ژن مرجع با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در چرخه‌ساز حرارتی شرکت بیوراد انجام گرفت. به‌منظور جداسازی قطعات DNA از ژل، از کیت تخلیص از ژل (N0041101) شرکت ژن‌مارک^۱ استفاده شد. جهت تخلیص، ابتدا باند مورد نظر ژن هدف را از روی ژل آگارز برش داده و در میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری قرار می‌دهیم و ژل جداسازی شده را وزن کرده و سپس با استفاده از کیت و دستورالعمل شرکت ژن‌مارک، قطعه مورد نظر را تخلیص و بعد از اتمام کار، غلظت قطعه جداسازی شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. برای وارد کردن قطعه خالص‌سازی شده از فرآیند همسانه‌سازی *TA* و ناقل PTG19 استفاده شد. برای این کار ابتدا ۱۵۰ نانوگرم قطعه و ۵۰ نانوگرم پلاسمید خالص‌سازی شده همراه با آنزیم تی فور DNA لیگاز و بافر مربوطه در حجم ۱۰ میکرولیتر در دمای ۱۶ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد. تأیید ورود قطعه به درون پلاسمید با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *C4H* انجام شد. برای تکثیر پلاسمید PTG19 حاوی ژن *C4H* از سلول‌های باکتری *DH5a* مستعد شده با محلول کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. برای این کار از روش ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سلسیوس استفاده شد. محلول باکتری ترانسفورم شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین پخش شد. با رشد تک کلون‌های انتخابی در محیط جدید، آزمون

2- Applied biosystem
3- Neighbor-Joining
4- Bootstrap
5- Inter Proscan online analysis
6- Motif search analysis

1- Gene Mark

Campanulaceae بعد از هویج با ۹۲ درصد بالاترین میزان تشابه را با توالی همسانه شده در مطالعه حاضر دارا بود.

بود. نکته جالب از این نتایج وجود شباهت بالا بین توالی *F. pseudalliacea* با گونه‌هایی خارج از خانواده چتریان (Apiaceae) می‌باشد. به عنوان مثال ژن *C4H* از *Platycodon grandifloras* از خانواده

جدول ۲- نتیجه Blastx ژن *C4H* از گیاه *F. pseudalliacea* به منظور بررسی شباهت توالی پیش‌بینی شده پروتئینی با سایر توالی‌های پروتئینی موجود در پایگاه داده ان‌سی‌بی‌آی.

Table 2. BlastX results for *C4H* gene from *F. pseudalliacea* in order to study its similarity with *C4H* sequence from other species in NCBI.

شماره ژن Accession number	درصد تشابه Identity (%)	مقدار مورد انتظار Expected (E) value	نام گونه Species name
XP_017252948.1	97%	0.0	<i>C4H(Daucus carota)</i>
KZM95399.1	97%	0.0	<i>C4H(Daucus carota)</i>
AIT52342.1	95%	0.0	<i>C4H11 (Daucus carota)</i>
AEM63672.1	92%	1e-178	<i>C4H(Platycodon grandiflorus)</i>
XP_021601102.1	91%	2e-177	<i>C4H (Manihot esculenta)</i>
ANR76395.1	91%	3e-177	<i>C4H(Camptotheca acuminata)</i>
XP_022764876.1	91%	1e-176	<i>C4H-like (Durio zibethinus)</i>
AEA72281.1	91%	1e-176	<i>C4H(Angelica gigas)</i>
Q43033.1	91%	2e-176	<i>C4H(Petroselinum crispum)</i>
AJD22263.1	91%	3e-176	<i>C4H(Angelica dahurica)</i>

حفظ شده Cytochrome P450 cysteine heme-
FGVGRRSCPG iron ligand signature با توالی
در خانواده سیتوکروم *P450* جز آن‌ها می‌باشد. این
موتیف در موقعیت ۲۶۰-۲۵۱ توالی اسید آمینه
C4H شناسایی شده ما قرار گرفته و دارای الگوی
[FW]-[SGNH]-X-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-
C-[LIVMFAP]-[GAD] می‌باشد. وجود تشابه بالا
بین ژن‌های *CH4* گونه‌های مختلف درون یک
خانواده گیاهی نشان‌دهنده فرآیند تکامل و حضور
ژن‌های اورتولوگ می‌باشد. بسیاری از جهش‌های
نوکلئوتیدی در سطح ژن، جهش‌های خاموشی^۳
می‌باشد که تغییری در توالی اسید آمینه و در نتیجه

درخت فیلوژنی^۱ حاصل از توالی پروتئینی
پیش‌بینی شده ژن *C4H* به خوبی ارتباط توالی در ۲۲
گونه گیاهی مختلف را نشان می‌دهد (شکل ۲). در
این درخت فیلوژنی، ژن *C4H* از گیاه سورگوم
(*Sorghum bicolor*) به عنوان گروه خارجی^۲ در
دندروگرام رویت می‌شود. همان‌طور که در شکل دیده
می‌شود این ژن با ژن‌های *C4H* سایر گیاهان
هم‌خانواده خود در یک گروه قرار گرفته است. این
ژن بالاترین تشابه را در سطح و پروتئین با ژن *C4H*
هویج نشان داد که با هم در یک زیر گروه قرار
گرفته‌اند. ژن *C4H* دارای ۷ موتیف بوده که موتیف

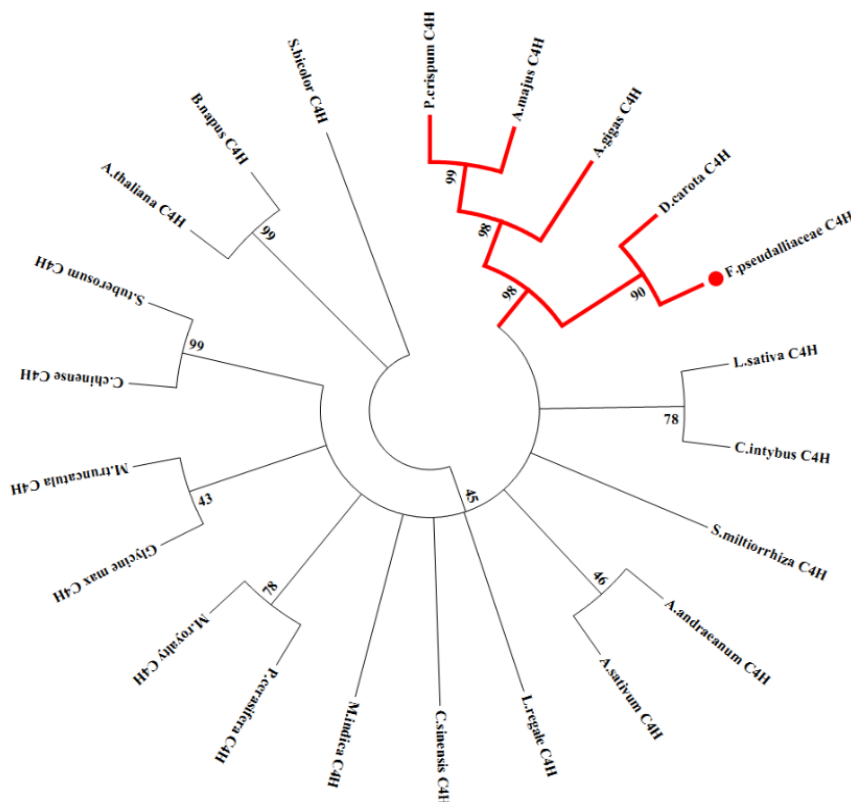
1- Phylogenetic dendrogram

2- Outgroup

3- Silent mutations

ارتباط با تأثیر بر سوبسترا و محصول نهایی آنزیم شود (۶، ۱۸).

تغییری در کارکرد آنزیم و پروتئین ایجاد نمی‌کند. این باعث اختصاصی شدن جایگاه‌های کارکردی آنزیم در



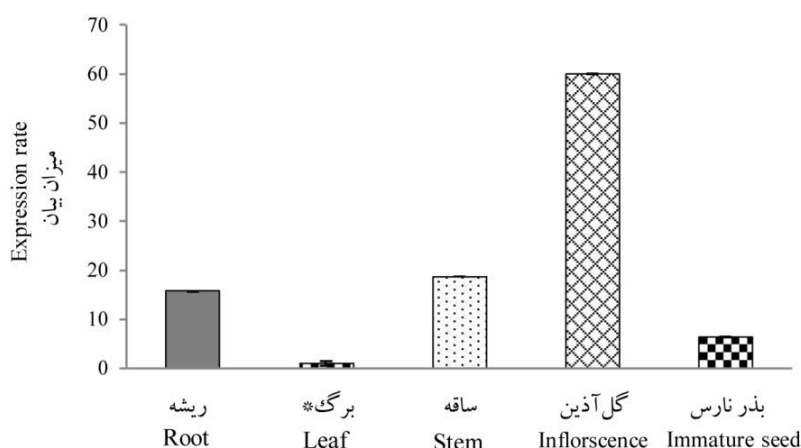
شکل ۲- درخت فیلوژنی حاصل از توالی پروتئینی ژن *C4H*. اندازه Bootstrap بالای ۴۰ نشان داده شده است.

Fig. 2. Phylogenetic tree resulted from nucleotide sequence of *C4H* gene. The bootstrap values higher than 40 have been shown.

این گیاه بیش‌ترین سطح رونویسی در ساقه و کم‌ترین میزان بیان در ریشه و برگ گزارش شده است. افزایش بیان چشمگیر این ژن در برگ‌ها بعد از تیمار با متیل جاسمونات همراه با افزایش قابل‌ملاحظه محتوای فلاونوئید می‌تواند نشان از نقش این ژن در مسیر بیوستز فلاونوئید باشد (۱۹). برای درک بهتر از نقش این ژن در بیوستز ترکیبات ثانویه، بررسی همزمان بیان ژن و همچنین پروفایل زیست شیمیایی اندام‌های مختلف پیشنهاد می‌شود. از طرف دیگر، بررسی همبستگی بین میزان بیان و سطح ترکیبات زیست شیمیایی می‌تواند به درک این فرآیند کمک کند.

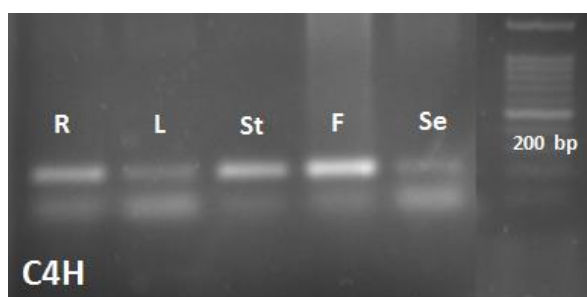
بررسی بیان ژن: بررسی بیان ژن *C4H* در بافت‌های مختلف آنغوزه تلخ *F. pseudalliaeeae* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی مشخص کرد که این ژن بالاترین سطح رونویسی را در گل‌آذین دارد و کم‌ترین میزان رونوشت نیز مربوط به بافت برگ می‌باشد (شکل ۳). این الگوی بیانی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز-رونویسی معکوس نیمه کمی^۱ نیز تأیید شد (شکل ۴). در تأیید با نتایج حاضر، بررسی الگوی بیانی ژن *C4H* در اندام‌های مختلف گیاه *Lepidium apetalum* نیز نشان‌دهنده بیان متفاوت این ژن در بافت‌های مختلف بوده است. در

1- Semi-quantitative RT-PCR



شکل ۳- نمودار میزان بیان ژن *C4H* در اندام‌های مختلف *F. pseudallicea* اندامی که دارای پایین‌ترین میزان بیان بوده و میزان بیان در سایر اندام‌ها نسبت به آن سنجیده شده، با * مشخص شده است.

Fig. 3. Expression of *C4H* gene based on Real-Time PCR in different organs of *F. pseudallicea* (R: root; St: stem; L: leaf; F: Inflorescence; S: immature seed).



شکل ۴- الگوی بیانی ژن *C4H* در اندام‌های مختلف گیاه *F. pseudallicea* روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (ریشه: R، ساقه: St، برگ: L، گل آذین: F، بذر نارس: Se).

Fig. 4. Expression pattern of *C4H* in different organs of *F. pseudallicea* on 1.2% agarose gel (R: root; St: stem; L: leaf; F: Inflorescence; Se: immature seed).

مختلف از الگوی بیانی یکسانی برخوردار نمی‌باشند. این سه ایزوفرم با نام‌های *CsC4Ha*، *CsC4Hb* و *CsC4Hc* نام‌گذاری شده‌اند. میزان بیان این ژن‌ها در مراحل مختلف تکامل برگ گیاه چای و همچنین در ساقه و ریشه اندازه‌گیری شده است. *CsC4Ha* بیان بالایی را در برگ‌های برداشت شده در مرحله ۴ تکامل و در ریشه داشته است. در مقابل *CsC4Hb* بالاترین سطح رونویسی را در برگ‌های کوچک و لطیف و برگ‌های رسیده کامل و بعد از آن در ساقه و ریشه داشته است که با مقدار فلاونوئیدها در مراحل

بیش بیان ژن *C4H* در گوجه‌فرنگی میزان رسوب لیگنین در ساقه را کاهش داد و در مقابل باعث افزایش میزان محتوای فلاونوئید در میوه شد. در این آزمایش با در دسترس قرار دادن مقدار بیش‌تر آنزیم *CYP73A24* مقدار لیگنین در ساقه به مقدار قابل‌ملاحظه‌ای افزایش یافت. می‌توان این برداشت را داشت که فرآیندهای نظارتی پیچیده‌ای در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و لیگنین دخالت دارند (۲۰). در گیاه چای (*Camellia sinensis*) سه ژن *C4H* شناسایی شده است. ایزوفرم‌های این ژن در بافت‌های

نداشته است و سطح رونویسی در ریشه نسبت به سایر بافت‌ها پایین‌تر گزارش شده است. در مقابل، سطح رونویسی *BnC4H2* در بذرتشخیص داده شده و با وجود بیان پایین ژن *BnC4H2* در تمام بافت‌های مورد آزمایش، سطح رونویسی آن در ریشه و گل‌ها نسبت به برگ و بذر بالاتر بوده است (۲۳).

نتیجه‌گیری

ژن *C4H* بالاترین میزان بیان را در گل‌آذین داشته است و به‌عنوان دومین ژن کلیدی مسیر فنیل‌پروپانویید می‌توان به نقش آن در تولید ترکیبات فنلی در بافت‌های ویژه پی‌برد زیرا معمولاً گل‌آذین در گونه‌های جنس *Ferula* دارای بیش‌ترین ترکیبات دارویی می‌باشند (۶). سایر پژوهش‌های انجام شده در گیاهان مختلف در زمینه بیان ژن *C4H* نشان از اختصاصی عمل کردن در تولید ترکیب‌های خاص، در بافت خاصی بوده است. با توجه به این‌که ترکیبات فنلی دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را به صورت مواد فرار (اسانس) و عصاره شامل می‌شود، برای پی‌بردن به نقش هر یک از ایزوفرم‌های ژن *FpsPAL* در اندام‌های مختلف نیاز به پژوهش بیش‌تر می‌باشد. با در نظر گرفتن سطح پایین رونویسی دو ژن *PAL* و *C4H* در برگ نسبت به سایر بافت‌ها، انتظار می‌رود میزان ترکیبات فنلی در این بافت پایین باشد. در صورتی که بررسی انجام شده نشان داده است با اختلاف نه‌چندان زیادی بعد از بذر رسیده، برگ نه تنها از محتوی قابل‌توجهی از ترکیبات فنلی برخوردار است بلکه نسبت به سایر بافت‌ها، دامنه گسترده‌تری از نظر انواع ترکیبات فنلی را دارا می‌باشد. نتیجه به‌دست آمده این احتمال را به وجود می‌آورد که ایزوفرم‌های دیگری از ژن *C4H* وجود داشته باشد که با روش‌هایی همانند RACE نیاز به شناسایی دارند.

مختلف گیاه چای مطابقت دارد. *CsC4Hc* به‌طور عمده در ساقه جوان بیان می‌شود و در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه چای میزان بیان متفاوتی دارد. میزان بیان این ژن در برگ‌های بالغ در مقایسه با برگ‌های کوچک و جوان بالاتر است (۲۱).

در گیاه رامی (*Boehmeria nivea*) سطوح رونویسی ژن *C4H* در مراحل مختلف رویشی در دو بافت آوند چوب و آوند آبکش اندازه‌گیری شد. این ژن در گیاه رامی در دو بافت ذکر شده دارای الگوی بیانی متفاوتی می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد که ژن *BnC4H* در مراحل ابتدایی رشد و نمو از سطح بیان پایین‌تری در آوند آبکش نسبت به آوند چوب برخوردار است. سطح بیان ژن *C4H* در طول مراحل رسیدن، به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در آوند چوب بالاتر بوده است. اگرچه در مراحل پایانی رشد، سطح رونویسی در آوند آبکش نیز افزایش می‌یابد. الگوی بیانی این ژن در گیاه رامی با الگوی بیانی *C4H* در صنوبر همان‌طور که در بخش بررسی منابع ذکر شده است مطابقت می‌کند. افزایش سطوح رونویسی در طول مراحل رشد و نمو می‌تواند بیانگر نقش این ژن در بیوسنتز و تجمع لیگنین در بافت‌های مختلف به‌خصوص ساقه باشد (۱۸). در گیاه سیر (*Allium sativum*) ژن *C4H* از الگوی بیانی ژن *PAL* در بافت‌های مختلف مانند سوخ، پیازک، ریشه و برگ پیروی می‌کند. این ژن بالاترین سطح رونویسی را در ریشه و کم‌ترین میزان بیان را در سوخ نشان داده است (۲۲). در گیاه کلزا دو ایزوفرم از ژن *C4H* شناسایی شده است. در بررسی انجام گرفته سطوح رونویسی این ژن‌ها در بافت‌های مختلف مشخص شد. *BnC4H1* در تمام بافت‌های مورد آزمایش به غیر از بذر قابل تشخیص بوده است. میزان بیان این ژن در میان سایر بافت‌ها اختلاف قابل‌توجهی

منابع

- Petrova, S.E. 2015. Life forms of *Apiaceae* in central Russia. *Nor. J. Bot.* 33: 6. 747-753.
- Bencheraiet, R., Kherrab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z. and Maurice, J. 2011. Flavonols and antioxidant activity of *Ammi visnaga* L. (*Apiaceae*). *Rec. Nat. Prod.* 5: 1. 52.
- Coruh, N., Celep, A.S. and Özgökçe, F. 2007. Antioxidant properties of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl., *Chaerophyllum macropodium* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from *Apiaceae* family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. *Food Chem.* 100: 3. 1237-1242.
- Pimenov, M. and Leonov, M. 2004. The Asian Umbelliferae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to South-West Asian taxa. *Turk. J. Bot.* 28: 1-2. 139-145.
- Mozaffarian, V. 2013. Iranian medicinal and aromatic plants. 2nd edition, Current Culture publication. 186p.
- Karimi, G., Iranshahi, M., Hosseinalizadeh, F., Riahi, B. and Sahebkar, A. 2010. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of terpenoid and coumarin derivatives from the genus *Ferula*. *Pharmacologyonline*. 1: 566-574.
- Dastan, D., Salehi, P., Ghanati, F., Gohari, A.R., Maroofi, H. and Alnajjar, N. 2014. Phytotoxicity and cytotoxicity of disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*. *Ind. Crop Prod.* 55: 43-48.
- Russell, D.W. and Conn, E.E. 1967. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 122: 1. 256.
- Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J.M., Jeltsch, J.M., Durst, F. and Werck-Reichhart, D. 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *PNAS.* 90: 9. 4102-4106.
- Du, H., Ran, F., Dong, H. L., Wen, J., Li, J. N. and Liang, Z. 2016. Genome-wide analysis, classification, evolution, and expression analysis of the cytochrome P450 93 family in land plants. *Plos One.* 11: 10. e0165020.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J.H., Van de Peer, Y. and Boerjan, W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 3. 1051-1071.
- Bell-Lelong, D.A., Cusumano, J.C., Meyer, K. and Chapple, C. 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis* (regulation in response to development and the environment). *Plant Physiol.* 113: 3. 729-738.
- Mizutani, M., Ohta, D. and Sato, R. 1997. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol.* 113: 3. 755-763.
- Betz, C., McCollum, T.G. and Mayer, R.T. 2001. Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in Valencia'orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Mol. Biol.* 46: 6. 741-748.
- Lu, S., Zhou, Y., Li, L. and Chiang, V.L. 2006. Distinct roles of cinnamate 4-hydroxylase genes in *Populus*. *Plant Cell. Physiol.* 47: 7. 905-914.
- Mazzara, M. and James, D.J. 2000. The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) tissue. *Mol. Biotech.* 15: 3. 237-241.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nat. Prot.* 3: 6. 1101.
- Liu, F., Chen, J.R., Tang, Y.H., Chang, H.T., Yuan, Y.M., Guo, Q.J.B. and Equipment, B. 2018. Isolation and characterization of cinnamate 4-hydroxylase gene from cultivated ramie (*Boehmeria nivea*). *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 32: 2. 324-331.

19. Zhao, L., Mali, G., Yang, Z.A., Feng, W.S. and Zheng, X.Ke. 2017. expression analysis of *C4H* gene from *Lepidium apetalum* [J]. Acta Pharmacol. Sin. 5: 821-831.
20. Millar, D.J., Long, M., Donovan, G., Fraser, P.D., Boudet, A.M., Danoun, S., Bramley, P.M. and Bolwell, G.P. 2007. Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids. Phytochemistry. 68: 11. 1497-1509.
21. Xia, J., Liu, Y., Yao, S., Li, M., Zhu, M., Huang, K., Gao, L. and Xia, T. 2017. Characterization and expression profiling of *Camellia sinensis* cinnamate 4-hydroxylase genes in phenylpropanoid pathways. Gene. 8: 8. 193.
22. Tuan, P.A., Park, N.I., Li, X., Xu, H., Kim, H.H., Park, S.U. 2010. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonialyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic (*Allium sativum*). J. Agric. Food Chem. 58: 20. 10911-10917.
23. Chen, A.H., Chai, Y.R., Li, J.N. and Chen, L. 2007. Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (*C4H*) from oilseed rape (*Brassica napus*). BMB Rep. 40: 2. 247-260.