

جداسازی ژن‌های لینالول سنتاز و پینن سنتاز از گیاه دارویی بومادران (*Achillea millefolium* L.)

مریم جاودان اصل^۱، حمید رجبی معماری^{۲*}، داریوش نباتی احمدی^۲ و افراسیاب راهنما قهفرخی^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۷)

چکیده

بومادران (*Achillea millefolium* L.) گیاهی علفی و چندساله از خانواده‌ی گل ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) می‌باشد. اسانس بومادران دارای ترکیب‌هایی از جمله مونوترپن و سزکوئین‌ترپن‌های مختلف است که لینالول و پینن از اجزای اصلی تشکیل دهنده آن می‌باشند. این دو ترکیب دارای ارزش دارویی و اثرات ضدآفت و ضد میکروبی هستند و در صنایع غذایی، عطرسازی و آرایشی و بهداشتی کاربرد دارند. هدف از تحقیق حاضر، استفاده از راهکار آغازگرهای هرز برای جداسازی ژن‌های لینالول سنتاز و پینن سنتاز از گیاه دارویی بومادران می‌باشد. در این تحقیق RNA کل از گیاه بومادران استخراج شد، سپس ژن‌های موردنظر با استفاده از آغازگرهای هرز و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر گردیدند. نتایج حاصل از PCR، تکثیر باندهای مورد نظر به ترتیب حدود ۷۲۰ و ۲۵۰ جفت باز را نشان داد. با آنالیزهای بیوانفورماتیکی، نتایج توالی‌یابی با داده‌های موجود در بانک ژن جهانی (NCBI) مقایسه گردید. نتایج بررسی تنوع بین گونه‌ها و خانواده‌های مختلف گیاهی و روابط فیلوژنتیکی بر اساس ژن‌های *Pis* و *Lis* نشان داد بیشترین میزان مشابهت بین گیاه بومادران و درمنه (*Artemisia annua*) و نیز بین خانواده‌های Asteraceae و Lamiaceae وجود دارد، به نحوی که در یک گروه قرار گرفتند. نتایج این پژوهش، مشابهت نسبتاً بالای توالی این ژن‌ها را با ژن‌های متناظر در سایر گیاهان نشان داد و صحت توالی‌یابی را تأیید نمود.

واژگان کلیدی: آغازگر هرز، بومادران، پینن سنتاز، ترپن‌ها، لینالول سنتاز

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: memari@scu.ac.ir

مقدمه

بومادران (*Achillea millefolium* L.) گیاهی علفی و چندساله از خانواده گل ستاره‌ای‌ها (Asteraceae یا Compositae) است (Omidbeygi, 2007) که در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها به طور عام و زخم‌ها و سوختگی‌ها به طور خاص مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Tajik and Shokohi Sabet Jalali, 2009). در گیاهان متابولیت‌های ثانویه به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ۱. ترین‌ها ۲. فنل‌ها ۳. آلکالوئیدها (Rispaï et al., 2005). تمام ترپنوئیدها از اتصال واحدهای ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (IDP) و ایزومر آلیلی آن دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMADP) سنتز می‌شوند (Cheng et al., 2007). ترپنوئیدها معمولاً بر اساس تعداد واحدهای ایزوپرنوئید موجود در ساختار خود به چند دسته از جمله مونوترپنوئیدها، دی‌ترپنوئیدها، سزکوئی‌ترپنوئیدها، تری‌ترپنوئیدها، تترا‌ترپنوئیدها تقسیم می‌شوند (Cseke et al., 1998). ترین‌ها ماهیتاً به علت طعم و بوی خاص و همچنین کیفیت‌های دارویی‌شان ترکیبات بسیار مهمی از نظر اقتصادی می‌باشند (Pichersky et al., 1994). مشتقات ترپنی همچنین برای تولید مواد دارویی مختلف مانند داروی ضد سرطان تاکسول و داروی ضد مالاریای آرتیمیزینین (از درمنه) نقش دارند (Jennewein and Croteau, 2001). گونه *Achillea millefolium* دارای ترکیب‌هایی از جمله مونوترپن و سزکوئی‌ترین‌های مختلف به عنوان اجزاء اصلی می‌باشد. اسانس آن بیشتر در کرک‌های ترش‌گیاه که در برگ، ساقه و به ویژه در گل‌ها موجود است، تشکیل می‌شود (Jaimand and Rezaee, 2004).

پنین (Pinene) و لینالول (Linalool) از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس بومادران هستند (Rohloff et al., 2007) که از نظر ساختار شیمیایی مونوترپن (Monoterpene) می‌باشند و به ترتیب توسط آنزیم پنین سنتاز (Pinene synthase) (Bohlmann et al., 1997) و لینالول سنتاز (Linalool synthase) از متابولیت میانی

ژرانیل دی فسفات (Geranyl-diphosphate) بیوسنتز می‌شوند (Cseke et al., 1998). لینالول ($C_{10}H_{18}O$) یک مونوترپن طبیعی و ترکیبی با بوی معطر بوده که در بسیاری از گل‌ها و گیاهان معطر یافت می‌شود و به دلیل بوی معطر، در ساخت ۸۰-۶۰٪ از مواد بهداشتی و مواد تمیزکننده مانند شامپوها، صابون‌ها و لوسیون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. لینالول به عنوان حشره‌کش نیز دارای کاربرد است. از نام‌های دیگر آن β -لینالول، ۶و۲ دی‌متیل ۷و۲ اکتا دی ان ۶-ال و لینالیل الکل می‌باشد (Christianson, 2006). لینالول باعث جذب حشرات گرده‌افشان مخصوصاً زنبور عسل می‌شود. فواید آروماتراپی آن عبارت از ایجاد روحیه شاد در انسان می‌باشد (Buchbauer et al., 1991). لینالول دارای خاصیت ضدتوموری است (Loizzo et al., 2007) و همچنین به عنوان یک حدواسط مهم در تولید ویتامین A و E نیز استفاده می‌شود (Mercier et al., 1994). لینالول که از ترکیبات روغن اساسی بیشتر زیرگونه‌های بومادران (*A. millefolium*) می‌باشد، قادر است مانع رشد بیش از ۱۷ نوع باکتری و ۱۰ نوع قارچ شود (Pattnaik et al., 1997). پنین با فرمول $C_{10}H_{16}$ و وزن مولکولی ۱۳۶/۲۳۶ g/mol یک مونوترپن دوحلقه‌ای معطر (Belletti et al., 2004) از طبقه ترین است. آلفا و بتا-پنین از نظر صنعتی بسیار مهم بوده و در ساخت انواع معطرکننده‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها و حشره‌کش‌ها، صابون‌ها، کرم‌ها، بخور، پاک‌کننده‌ها، رنگ، لاک، روکش، لاستیک و تهیه حلال‌ها به کار می‌روند (Chalchat et al., 2001).

تاکنون ژن *Pis* در گیاهانی مانند درمنه (*Artemisia annua*) از خانواده Asteraceae (Lu et al., 2002)، مریم گلی (*Salvia officinalis*) (Gambliel and Croteau, 1982)، نخود (*Cicer arietinum*) (McKay et al., 2003)، نراد (*Abies grandis*) (Bohlmann et al., 1997)، گوجه وحشی (*Solanum habrochaites*) (Gonzales-Vigil et al., 2012) و ژن لینالول سنتاز در بسیاری از گونه‌های گیاهی مانند درمنه (Jia et al.,

گردیدند. مقایسه و هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی متناظر با هریک از ژن‌های موردنظر در گیاهان خانواده‌های نزدیک به خانواده بومادران و به‌ویژه گیاهان هم‌خانواده اش مانند درمنه صورت گرفت و براساس نواحی حفاظت‌شده، یک جفت آغازگر هرز (Degenerate primer) مستقیم و معکوس برای هر یک از ژن‌های *Pis* و *Lis* برای تکثیر قطعه‌های مورد نظر از ژنوم گیاه بومادران طراحی گردید (جدول ۱). ساخت آغازگرها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی صورت گرفت.

استخراج RNA کل: استخراج RNA از نمونه‌های برگ و گل با استفاده از دستورالعمل Rneasy Plant Mini kit (Qiagen) بر اساس روش ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت انجام گردید. به‌منظور حذف DNA از RNA استخراج شده، از آنزیم DNase شرکت Fermentas آلمان استفاده شد. در نهایت لوله‌ی حاوی RNA برای استفاده طولانی مدت به فریزر °C ۸۰- منتقل گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با بارگذاری بر روی ژل آگارز ۱٪ و تعیین غلظت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ مشخص گردید. برای محاسبه‌ی غلظت RNA استخراج‌شده از فرمول زیر استفاده شد (X) = غلظت RNA تک رشته‌ای در نمونه).

$$X \text{ ng}/\mu\text{l} = \text{OD}_{260} \times 50$$

(1999, Iijima et al.,) (*Ocimum basilicum*)، ریحان (2004, Nieuwenhuizen et) (*Malus domestica*)، سیب (al., 2013) و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) (Aubourg et al., 2002) جداسازی و توالی‌یابی گردیده است. همچنین از گیاهان خانواده Asteraceae جداسازی سایر ژن‌های مسیرهای دارویی مانند ژن پارتنولید سنتاز (Parthenolide synthase) از بابونه کبیر (Tanacetum parthenium) (Liu et al., 2014)، Germacrene A synthase، کاسنی (*Cichorium intybus*) (Bouwmeester et al., 2002) و (*Ixeris dentata*) Kim (et al., 2005) و ژن Amorpho-4,11-diene synthase (ADS) از گیاه درمنه (Chang et al., 2000) گزارش گردیده‌اند. تاکنون هیچ اطلاعاتی در مورد ژن‌های سنتزکننده لینالول و پینن در گیاه بومادران در بانک ژن جهانی وجود ندارد. پژوهش حاضر، به‌منظور جداسازی ژن‌های *Lis* و *Pis* با طراحی پرایمرهای مناسب، از گیاه بومادران هزاربرگ صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گل و برگ بومادران مورد استفاده در این تحقیق از باغ گیاه‌شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور در مرحله گل‌دهی جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌ها پس از برداشت، با نیتروژن مایع (دمای °C ۱۹۶-) تثبیت شدند و به فریزر °C ۸۰- منتقل

جدول ۱- توالی‌های آغازگرهای مستقیم و معکوس طراحی شده به کمک نرم افزار Mega 5

Table 1. The sequences of forward and backward primers desined by Mega5

ژن	آغازگر	توالی آغازگر	توالی هرز
Gene	Primer	Primer sequence (5' - 3')	Degenerate sequence
<i>Pis</i>	F-PIN	GAGTTTGCSAAACTSGACTTCAA	S [C/G]
<i>Pis</i>	R-PIN	GTACCATACACATCRTAAACATCRTC	R [A/G]
<i>Lis</i>	F-LIN	ACTCTCGATGATGTYTAYGA	Y [C/T]
<i>Lis</i>	R-LIN	GTATCACCTCTYTCCATYTC	Y [C/T]

سنتز رشته اول cDNA: برای تبدیل RNA به DNA به‌عنوان قالبی برای شروع فرآیند PCR، سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت QIAGEN توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Reverse Transcriptase) Omniscript و پرایمر Oligo-dT انجام گردید.

تکثیر ژن پنین سنتاز و لینالول سنتاز به روش PCR: به منظور تکثیر ژن‌های *Lis* و *Pis* به روش PCR از آغازگرهای دژنره مستقیم (Forward primer) و معکوس (Reverse primer)، cDNA سنتز شده گل به عنوان الگو و آنزیم Taq DNA Polymerase شرکت Roche و Biolabs استفاده گردید (جدول ۲). جهت تعیین دمای اتصال دقیق برای تکثیر جفت آغازگر، از برنامه شیب دمایی استفاده شد. سپس، محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer ارسال گردید.

نتایج و بحث

استخراج RNA: ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراجی از بافت‌های برگ و گل بومادران با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفتومتر انجام گردید (شکل ۱). کیفیت RNA استخراج شده ۱/۸۹ و غلظت آن ۲۸۶۰ ng/μl به دست آمد که کیفیت مناسبی بود.

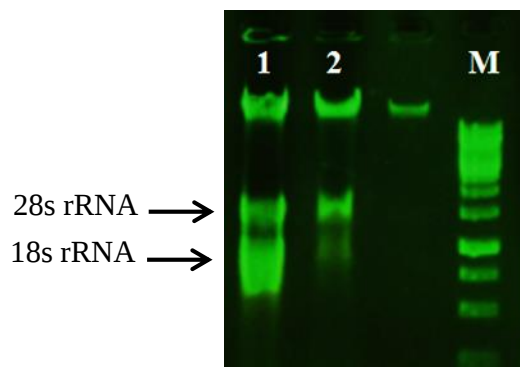
تکثیر ژن پنین سنتاز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: به‌منظور سنتز DNA دورشته‌ای و تکثیر و جداسازی ژن پنین سنتاز از آغازگرهای هرز مستقیم و معکوس (*F-PIN* و *R-PIN*) استفاده شد که این کار با استفاده از آنزیم Taq DNA Polymerase شرکت Roche و cDNA سنتز شده از RNA استخراج شده از گل بومادران (به‌دلیل داشتن کیفیت بهتر نسبت به برگ) به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز صورت پذیرفت. به‌منظور تعیین دمای اتصال دقیق برای تکثیر جفت آغازگر، از برنامه شیب دمایی استفاده شد. پس از انجام PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز، تکثیر قطعه موردانتظار با طول حدود ۲۵۰ bp را برای ژن پنین سنتاز نشان داد (شکل ۲) و دمای بهینه برای اتصال، جهت تکثیر این ژن به‌وسیله آغازگرهای هرز طراحی شده، ۵۵ °C تعیین گردید.

بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن پنین سنتاز: نتایج حاصل از جستجوی شباهت توالی به‌دست‌آمده در بومادران برای ژن پنین سنتاز نشان داد که این قطعه دارای شباهت بالایی با توالی ژن *Pis* از گونه‌های گیاهی دیگر می‌باشد. نتیجه حاصل از Blastn نشان داد که این توالی بیشترین شباهت را با ژن *Pis* مربوط به گونه دیگر خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها (*Asteraceae*)

جدول ۲- اجزای واکنش PCR برای ژن‌های *Lis* و *Pis*

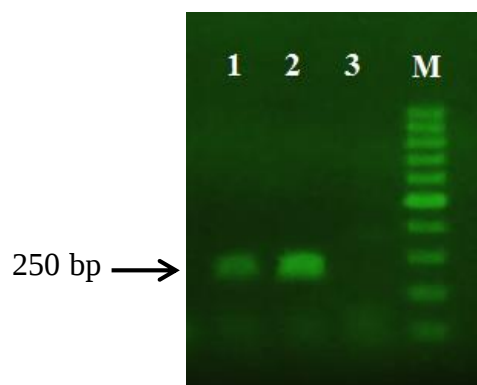
Table 2. The components of PCR reaction for *Pis* and *Lis* genes

حجم (میکرولیتر) Volume (μl)		غلظت نهایی در ۲۵ میکرولیتر Final concentration in 25 μl		مواد Materials
<i>Lis</i>	<i>Pis</i>	<i>Lis</i>	<i>Pis</i>	
4.00	2.00	200 ng	200 ng	cDNA الگو Template cDNA
0.50	0.50	0.20 mM	0.20 mM	(10 mM) dNTPs
1.25	1.00	0.50 μM	0.40 μM	آغازگر هرز مستقیم (10 μM) Forward degenerate primer
1.25	1.00	0.50 μM	0.40 μM	آغازگر هرز معکوس (10 μM) Reverse degenerate primer
0.25	0.15	0.02 U	1.25 U	Taq DNA Polymerase
5.00	2.50	(2.00 mM) 1X	(1.5 mM) 1X	(Containing MgCl ₂) PCR buffer
12.75	17.85	Up to 25 μl	Up to 25 μl	آب مقطر دیونیزه استریل Sterile deionized distilled water



شکل ۱- نتایج استخراج RNA روی ژل آگارز ۱٪. چاهک ۱ و ۲: RNA، چاهک M: مارکر مولکولی ۱ kb (شرکت فرمنتاز)

Figure 1. Results of RNA extraction on 1% agarose gel. 1 and 2: RNA, M: 1Kb Marker (Fermentas)



شکل ۲- نتایج PCR ژن *Pis* روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ و ۲: محصول PCR، چاهک M: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp (از شرکت فرمنتاز)، چاهک ۳: کنترل منفی

Figure 2. PCR results of *Pis* gene on 1% agarose gel. 1 and 2: PCR product of *Pis*, M: 100bp Marker (Fermentas), 3: Negative control

هم‌ردیف‌سازی آن با توالی‌های پروتئینی مربوط به این ژن در سایر گیاهان موجود در پایگاه داده توسط نرم افزار Mega ver5 انجام شد. نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی صحت توالی بدست آمده مربوط به ژن *Pis* در گیاه بومادران را تأیید نمود. نتایج نشان داد که توالی پروتئینی مربوط به ژن *Pis* در گیاه *Achillea millefolium* با گیاه هم‌خانواده‌اش *Artemisia annua* که هر دو متعلق به خانواده Asteraceae هستند و با توالی‌های پروتئینی در دو جنس *Rosmarinus* و *Lavandula pedunculata* و همگی *officinalis* که متعلق به خانواده Lamiaceae و همگی متعلق به راسته Asterales هستند، به‌خوبی هم‌ردیف شدند.

بررسی تنوع بین گونه‌ها و خانواده‌های مختلف گیاهی مربوط به ژن پینن سنتاز *Pis* و *Lis*: جهت بررسی تنوع،

موجود در پایگاه داده NCBI یعنی با درمنه (*Artemisia annua*)، (Lu et al., 2002) به میزان ۹۴٪ دارا می‌باشد. بنابراین صحت توالی‌های به دست آمده از این طریق تأیید گردید. همچنین توالی ژن *Pis* جداسازی شده از گیاه بومادران در این پژوهش با نتایج گزارش شده جداسازی این ژن از سایر گیاهان مانند مریم گلی (Gambliel and Croteau, 1982)، نراد (Bohlmann et al., 1997)، سیب (Nieuwenhuizen et al., 2013)، نخود (McKay et al., 2003)، گوجه وحشی (*Solanum habrochaites*) (Gonzales-Vigil et al., 2012) و غیره مشابهت داشت. جهت بررسی توالی پروتئینی، ابتدا توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار Vector NTI به توالی پروتئینی ترجمه گردید. سپس چهارچوب قرائت صحیح به‌دست آمد و توالی پروتئینی حاصل جهت

matK) بین خانواده Asteraceae با خانواده Lamiaceae قرابت ژنتیکی وجود دارد. در این پژوهش نیز نتایج حاصل از رسم نمودار خوشه‌ای برای ژن *Pis* خانواده Asteraceae با گیاهان مربوط با خانواده Lamiaceae کمترین میزان تنوع را نشان داده و در یک گروه قرار گرفتند که با نتایج حاصل از طبقه بندی بر اساس ژن‌های کلروپلاستی توسط برمر و همکاران، هم‌سو می‌باشد.

تکثیر ژن لینالول سنتاز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: به‌منظور سنتز DNA دورشته‌ای و تکثیر و جداسازی ژن *Lis* از cDNA سنتز شده با استفاده از RNA استخراج شده از گل بومادران، آغازگرهای دژنره F-LIN و R-LIN و آنزیم Taq DNA Polymerase شرکت BioLabs در PCR استفاده گردید. جهت تعیین دمای اتصال دقیق برای تکثیر جفت آغازگر، از برنامه شیب دمایی استفاده شد. سپس، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. نتایج حاصل، تکثیر قطعه موردانتظار با طول حدود ۷۲۰ bp را برای ژن *Lis* نشان داد (شکل ۴). دمای بهینه اتصال ۵۵ °C تعیین شد.

بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن لینالول سنتاز: نتایج حاصل از جستجوی شباهت توالی به‌دست‌آمده در بومادران برای ژن *Lis* نشان داد که این قطعه دارای شباهت بالایی با توالی ژن *Lis* از گونه‌های گیاهی دیگر می‌باشد. طبق نتایج حاصل از Blastn، این توالی بیشترین شباهت را با توالی ژن *Lis* مربوط به گونه دیگر خانواده گل ستاره‌ای ها (Asteraceae) موجود در پایگاه داده یعنی با درمنه (*Artemisia annua*) به‌میزان ۹۴٪ دارا می‌باشد. بنابراین صحت توالی بدست آمده از این طریق تأیید گردید. توالی ژن *Lis* جداسازی شده از گیاه بومادران با نتایج گزارش شده جداسازی این ژن در سایر گیاهان از جمله درمنه (Jia et al., 1999)، نعناع (*Mentha piperita*) (Crowell et al., 2002)، ریحان (*Iijima et al.*, 2004)، *Clarkia concinna* (Cseke et al., 1998)، سیب (Nieuwenhuizen et al., 2013)، آرابیدوپسیس (Aubourg et al., 2002) و غیره مشابهت دارد.

میانگین Pairwise distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance بین گونه‌های مختلف و بین خانواده‌های مختلف گیاهی برای ژن *Pis* محاسبه شد. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، بر اساس مدل K2P کمترین تنوع بین *Achillea millefolium* و گیاه هم‌خانواده‌اش *Artemisia annua* و بیشترین تنوع به‌ترتیب بین *Achillea millefolium* و *Solanum habrochaites* و *Abies grandis* بود. نتایج به‌دست‌آمده بر اساس مدل P-distance نیز با نتایج حاصل از مدل K2P مطابقت داشت. در بررسی تنوع بین خانواده‌های مختلف گیاهی که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است، میانگین کل تنوع براساس مدل K2P و مدل P-distance برای کل خانواده‌های مورد بررسی به ترتیب ۰/۶۷۰ و ۰/۴۰۷ بود. برای ژن *Pis* کمترین اختلاف بین خانواده Asteraceae با خانواده Lamiaceae مشاهده گردید و بیشترین اختلاف آن به ترتیب با خانواده‌های Solanaceae و Pinaceae مشاهده شد.

بررسی روابط فیلوژنتیکی بر اساس ژن پنین سنتاز: به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی برای ژن *Pis* بین بومادران و سایر گیاهان موجود در پایگاه داده NCBI درخت فیلوژنی بر پایه روش UPGMA با استفاده از نرم افزار Mega ver5 رسم گردید (شکل ۳). همان‌طور که در شکل مشخص است، گونه‌های *Achillea millefolium* و *Artemisia annua* که هر دو متعلق به خانواده Asteraceae هستند، در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و کمترین فاصله را با گونه‌های *Rosmarinus officinalis* و *Lavandula pedunculata* متعلق به خانواده Lamiaceae داشته که همگی متعلق به راسته Asterales می‌باشند و بیشترین فاصله را با گیاهان متعلق به خانواده Pinacea دارند. این نتایج با نتایج حاصل از تعیین تنوع با مقیاس k2P هم‌خوانی دارد.

برمر و همکاران (Bremer et al., 2002) گزارش نمودند که برطبق مطالعات فیلوژنی صورت‌گرفته بین خانواده‌های گیاهی بر اساس شش ژن کلروپلاستی (مانند *rbcL* و

جدول ۳- میانگین Pairwise-distance بر اساس مدل K2P بین گونه‌های مختلف گیاهی مربوط به ژن *Pis*

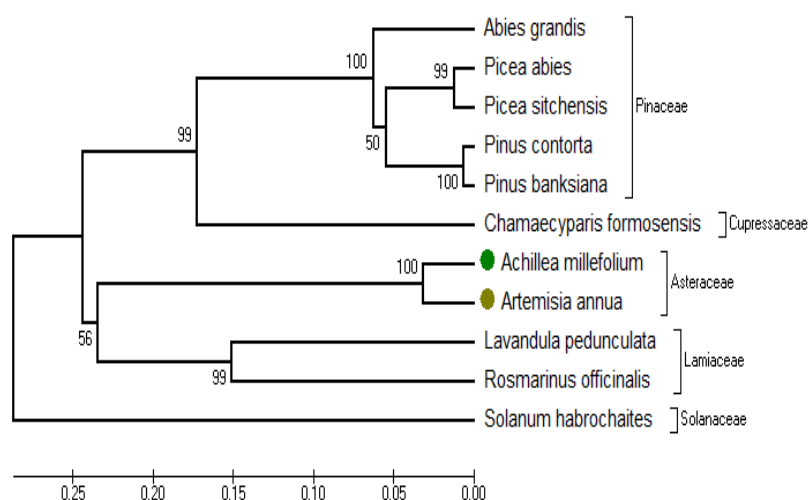
Table 3. Pairwise-distance average regarding K2P model among different plant species for *Pis* gene

گونه گیاه Plant species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>Achillea millefolium</i>										
2. <i>Artemisia annua</i>	0.066									
3. <i>Rosmarinus officinalis</i>	0.815	0.837								
4. <i>Lavandula pedunculata</i>	0.664	0.679	0.396							
5. <i>Solanum habrochaites</i>	0.981	1.031	1.084	1.233						
6. <i>Pinus banksiana</i>	0.764	0.764	0.781	0.761	1.108					
7. <i>Abies grandis</i>	0.879	0.902	0.808	0.710	1.173	0.146				
8. <i>Picea abies</i>	0.835	0.815	0.779	0.695	1.029	0.124	0.131			
9. <i>Chamaecyparis formosensis</i>	0.816	0.779	0.866	0.800	1.066	0.453	0.446	0.480		
10. <i>Pinus contorta</i>	0.782	0.782	0.800	0.796	1.138	0.013	0.161	0.139	0.453	
11. <i>Picea sitchensis</i>	0.834	0.815	0.778	0.727	1.080	0.101	0.116	0.026	0.491	0.116

جدول ۴- میانگین Pairwise-distance بر اساس مدل K2P بین خانواده‌های گیاهی مربوط به ژن *Pis*

Table 4. Pairwise-distance average regarding K2P model among plant families for *Pis* gene

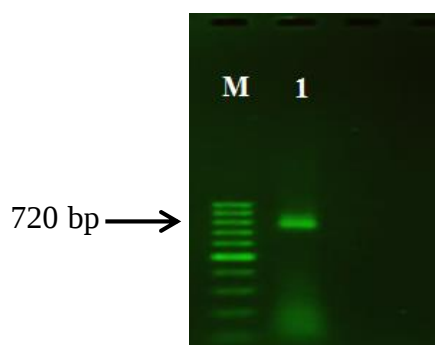
خانواده Family	1	2	3	4	5
1. <i>Asteraceae</i>					
2. <i>Lamiaceae</i>	0.749				
3. <i>Solanaceae</i>	1.006	1.158			
4. <i>Pinaceae</i>	0.817	0.763	1.105		
5. <i>Cupressaceae</i>	0.798	0.833	1.066	0.465	



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی مربوط به روابط ژنتیکی بومادران با سایر گیاهان موجود در پایگاه NCBI بر اساس ژن *Pis*

استفاده از روش UPGMA

Figure 3. Phylogenetic tree for relationship of Achilleae *Pis* gene with other plants *Pis* sequences available in NCBI based on UPGMA method



شکل ۴- نتایج PCR ژن *Lis* روی ژل آگارز، چاهک ۱: محصول PCR، چاهک M: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp از (شرکت فرمنتاز)
Figure 4. PCR results of *Lis* gene on agarose gel, 1: PCR product of *Pis*, M: 100bp Marker (Fermentas)

به‌دست‌آمده بر اساس مدل P-distance با نتایج حاصل از مدل K2P مطابقت داشت. میانگین تنوع برای همه خانواده‌ها بر اساس مدل K2P و P-distance به ترتیب برابر با ۰/۸۸۱ و ۰/۴۸۱ به‌دست آمد. داده‌های حاصل از محاسبه میانگین بر اساس مدل K2P بین خانواده‌های گیاهی در جدول ۶ ارائه شده‌است. برای ژن *Lis* کمترین اختلاف بین خانواده‌های Asteraceae و Lamiaceae و بیشترین اختلاف به ترتیب بین خانواده‌های Asteraceae با خانواده‌های Onagraceae و Poaceae مشاهده گردید.

بررسی روابط فیلوژنتیکی بر اساس ژن لینالول سنتاز: به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی برای ژن *Lis* بین بومادران و سایر گیاهان موجود در پایگاه داده NCBI درخت فیلوژنی بر پایه روش UPGMA توسط نرم افزار Mega ver5 ترسیم شد (شکل ۵). دندروگرام مربوطه نشان داد که *Achillea millefolium* نزدیک‌ترین فاصله را با دیگر جنس خانواده Asteraceae یعنی *Artemisia annua* و بیشترین فاصله ژنتیکی را به ترتیب با جنس‌های *Clarkia breweri* و *Oriza Sativa* دارد که نتایج حاصله با نتایج به‌دست‌آمده از محاسبه میانگین بر پایه مدل K2P هم‌سو می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۶ و در دندروگرام مربوط به گروه‌بندی خانواده‌های گیاهی بر اساس ژن *Lis* مشاهده می‌شود، اختلاف تنوع کم بین خانواده‌های Asteraceae و Lamiaceae که به ترتیب متعلق به راسته Asterales و Lamiales می‌باشند، به‌دلیل گروه‌بندی آن‌ها در رده Asterids می‌باشد که قرابت این راسته‌ها با استفاده

جهت بررسی توالی پروتئینی، توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI به توالی پروتئینی ترجمه شد. سپس چهارچوب قرائت صحیح به‌دست آمد و توالی پروتئینی حاصل جهت هم‌ردیف‌سازی آن با توالی‌های پروتئینی مربوط به این ژن در سایر گیاهان موجود در پایگاه داده توسط نرم افزار Mega ver5 انجام شد. نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی صحت توالی بدست آمده مربوط به ژن *Lis* در گیاه بومادران را تأیید نمود. طبق نتایج، توالی پروتئینی مربوط به ژن *Lis* در گیاه *Achillea millefolium* با گیاه هم‌خانواده‌اش *Artemisia annua* که هر دو متعلق به خانواده Asteraceae هستند و با توالی‌های پروتئینی در دو جنس *Lavandula latifolia* و *Perilla frutescens* که متعلق به خانواده Lamiaceae و همگی متعلق به راسته Asterales هستند، به‌خوبی هم‌ردیف شدند.

بررسی تنوع بین جنس‌ها و خانواده‌های مختلف گیاهی مربوط به ژن لینالول سنتاز: به‌منظور بررسی تنوع، میانگین Pairwise distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance بین گونه‌های مختلف و بین خانواده‌های مختلف گیاهی برای ژن *Lis* محاسبه گردید. همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، بر اساس مدل K2P کمترین تنوع بین *Achillea millefolium* و گیاه هم‌خانواده‌اش *Artemisia annua* و بیشترین تنوع به ترتیب بین *Achillea millefolium* با *Solanum habrochaites* و *Abies grandis* می‌باشد. نتایج

است (Ojimelukwe and Adler, 1999). بنابراین نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند جهت تولید ترکیبات دارویی و ایجاد و افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌ها از طریق اسانس و تولید سوخت‌های زیستی از طریق مهندسی متابولیک باکتری *E.coli* و مخمر ساکارومایسس سرویزیه جهت تولید سوخت از پیش‌سازهای ترپنوئیدی به‌دلیل داشتن ترکیبات احیاشونده و سطح انرژی بالا استفاده شود. همچنین نتایج پژوهش حاضر می‌تواند جهت مطالعات بیان ژن، بررسی‌های فیلوژنتیک و استفاده از راهکارهای مهندسی ژنتیک جهت افزایش بیان ژن‌های مذکور و تولید مواد مؤثره بیشتر و نیز تجاری‌سازی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

از ژن کلروپلاستی *rbcL* تأیید گردیده است (Gustafsson et al., 1996). لایت و همکاران (Leite et al., 2007) بیان داشتند که اوژنول (Eugenol) و آلفا و بتا- پینن دارای پتانسیل ضد میکروبی شدیدی بوده و می‌توانند به‌عنوان ترکیبات ضد میکروبی در فورمولاسیون‌های دارویی به‌کار روند. پراتا- یحیا و همکاران (Peralta-Yahya et al., 2012) گزارش نمودند پینن و تعدادی دیگر از مونوترپن‌های حلقوی مانند لیمونن، سابینن و ترپینن به‌عنوان پیش‌سازهای بالقوه سوخت‌های زیستی برای جت شناخته می‌شوند. خاصیت حشره‌کشی اسانس حاوی پینن و لینالول روی برخی آفات انباری مانند شپشه آرد (*Tribolium castaneum*) و سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus*) گزارش شده

جدول ۵- محاسبه میانگین Pairwise-distance بر اساس مدل K2P بین گونه‌های مختلف گیاهی مربوط به ژن *Lis*

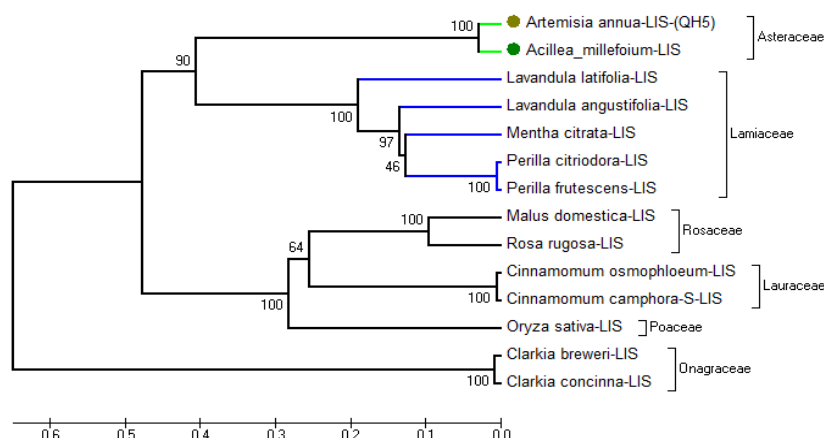
Table 5. Pairwise-distance average regarding K2P model among different plant species for *Lis* gene

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Achillea millefolium</i>													
2. <i>Artemisia annua</i>	0.059												
3. <i>Cinnamomum camphora</i>	0.995	1.004											
4. <i>Cinnamomum osmophloulm</i>	0.963	0.971	0.012										
5. <i>Clarkia breweri</i>	1.188	1.210	1.127	1.167									
6. <i>Clarkia concinna</i>	1.210	1.233	1.127	1.167	0.016								
7. <i>Lavandula angustifolia</i>	0.814	0.750	0.991	0.977	1.286	1.286							
8. <i>Lavandula latifolia</i>	0.795	0.762	0.855	0.855	1.254	1.254	0.410						
9. <i>Malus domestica</i>	0.875	0.870	0.498	0.482	1.208	1.220	0.952	1.006					
10. <i>Mentha citrate</i>	0.905	0.866	1.048	1.033	1.360	1.355	0.264	0.410	0.913				
11. <i>Oryza sativa</i>	1.003	1.077	0.537	0.538	1.562	1.526	1.054	1.082	0.631	0.994			
12. <i>Perilla citriodora</i>	0.822	0.776	0.936	0.937	1.369	1.365	0.269	0.349	0.824	0.258	0.995		
13. <i>Perilla frutescena</i>	0.837	0.789	0.909	0.910	1.386	1.369	0.257	0.356	0.814	0.252	0.985	0.012	
14. <i>Rosa rugosa</i>	0.967	0.959	0.529	0.530	1.501	1.444	1.054	0.952	0.192	0.939	0.555	0.880	0.880

جدول ۶- محاسبه میانگین Pairwise-distance بر اساس مدل K2P بین خانواده‌های گیاهی مربوط به ژن *Lis*

Table 6. Pairwise-distance average regarding K2P model among plant families for *Lis* gene

خانواده Family	1	2	3	4	5
1. Asteraceae					
2. Lamiaceae	0.983				
3. Onagraceae	1.210	1.147			
4. Lamiaceae	0.811	0.945	1.327		
5- Rosaceae	0.918	0.510	1.343	0.921	
6. Poaceae	1.040	0.538	1.544	1.022	0.593



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی مربوط به بومادران و سایر گیاهان موجود در پایگاه NCBI بر اساس ژن Lis با استفاده از روش

UPGMA

Figure 5. Phylogenetic tree for relationship of Achilleae Lis gene with other plants Lis sequences available in NCBI based on UPGMA method

References

- Aubourg, S., Lecharny, A. and Bohlmann, J. (2002). Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabidopsis thaliana. *Molecular Genetics and Genomics*, **267**(6): 730-745.
- Belletti, N., Ndagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. and Gardini, F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essence on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6932-6938.
- Bohlmann, J., Steele, C.L. and Croteau, R. (1997). Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S, 5S)-pinene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **272** (35): 21784-21792.
- Bouwmeester, H.J., Kodde, J., Verstappen, F.W.A., Altug, I.G., de Kraker, J.W., Wallaart, T.E. (2002). Isolation and characterization of two germacrene a synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiology*, **129**, 134-144.
- Bremer, B., Bremer, K., Heidari, N., Erixon, P., Olmstead, R.G., Anderberg, A.A. Källersjö, M. and Barkhordarian, E. (2002). Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **24**(2): 274-301.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jager, W., Dietrich, H. and Plank, C. (1991). Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z. Naturforsch*, **46**: 1067-1072.
- Chalchat, J.C., Gorunovic, M.S., Petrovic, S.D. and Maksimovic, Z.A. (2001). Chemical composition of two wild species of the genus *Salvia* L. From Yugoslavia: *Salvia aethiopis* and *Salvia verticillata*. *Journal of Essential Oil Research*, **13**(6): 416-418.
- Chang, Y.J., Song, S.H., Park, S.H. and Kim, S.U. (2000). Amorpha-4, 11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **383**(2): 178-184.
- Cheng, A.X., Lou, Y.G., Mao, Y.B., Lu, S., Wang, L.J and Chen, X.Y. (2007). Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions, *Journal of Integrative Plant Biology*, **49**(2): 179-186.
- Christianson, D.W. (2006). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chemical Reviews*, **106** (8): 3412-3442.
- Crowell, A.L., Williams, D.C., Davis, E.M., Wildung, M.R. and Croteau, R. (2002). Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **405**(1): 112-121.
- Cseke, L., Dudareva, N. and Pichersky, E. (1998). Structure and evolution of linalool synthase. *Molecular Biology and Evolution*, **15**(11): 1491-1498.
- Gambliel, H. and Croteau, R. (1982). Biosynthesis of (+/-)-alpha-pinene and (-)-beta-pinene from geranyl pyrophosphate by a soluble enzyme system from sage (*Salvia officinalis*). *The Journal of Biological Chemistry*, **257**(5): 2335-2342.

- Gonzales-Vigil, E., Hufnagel, D.E., Kim, J., Last, R.L. and Barry, C.S.** (2012). Evolution of TPS20-related terpene synthases influences chemical diversity in the glandular trichomes of the wild tomato relative *Solanum habrochaites*. *The Plant Journal*, **71**(6): 921-935.
- Gustafsson, M.H., Backlund, A. and Bremer, B.** (1996). Phylogeny of the Asterales sensu lato based on rbcL sequences with particular reference to the Goodeniaceae. *Plant Systematics and Evolution*, **199**(3): 217-242.
- Iijima, Y., Gang, D.R., Fridman, E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E.** (2004). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology*, **134**(1): 370-379.
- Jaimand, K. and Rezaee, M.B.** (2004). Investigation on Chemical Constituents of Essential oils from *Achillea millefolium* L. subsp. *mellefolium* by Distillation methods. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, **20**: 181-190 (In Persian).
- Jennewein, S. and Croteau, R.** (2001). Taxol: biosynthesis, molecular genetics and biotechnological applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**(1): 13-19.
- Jia, J.W., Crock, J., Lu, S., Croteau, R. and Chen, X.Y.** (1999). (3R)-Linalool synthase from *Artemisia annua* L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **372**(1): 143-149.
- Kim, M.Y., Chang, Y.J., Bang, M.H., Baek, N.I., Jin, J., Lee, C.H. and Kim, S.U.** (2005). cDNA isolation and characterization of (+)-germacrene A synthase from *Isomeris dentata* form. *Lbiflora* Hara. *Journal of Plant Biology*, **48**(2): 178-186.
- Leite, A.M., Lim, E.D.O., Souza, E.L.D., Diniz, M.D.F.F.M., Trajano, V.N. and Medeiros, I.A.D.** (2007). Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **43**(1): 121-126.
- Liu, Q., Manzano, D., Tanić, N., Pesic, M., Bankovic, J., Pateraki, I., Ricard, L., Ferrer, A., Vos, R., Krol, S. and Bouwmeester, H.** (2014). Elucidation and in planta reconstitution of the parthenolide biosynthetic pathway. *Metabolic Engineering*, **23**: 145-153.
- Loizzo, M.R., Tundis, R. and Menechini, F.** (2007). Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Research*, **27**: 3293-3300.
- Lu, S., Xu, R., Jia, J.W., Pang, J., Matsuda, S.P. and Chen, X.Y.** (2002). Cloning and functional characterization of a β -pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiology*, **130**(1): 477-486.
- McKay, S.A.B., Hunter, W.L., Godard, K.A., Wang, S.X., Martin, D.M., Bohlmann, J. and Plant, A.L.** (2003). Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development and gene expression of (-)-pinene synthase in Sitka spruce. *Plant Physiology*, **133**(1): 368-378.
- Mercier, C. and Chabardes, P.** (1994). Organometallic chemistry in industrial vitamin A and vitamin E synthesis. *Pure and Applied Chemistry*, **66**(7): 1509-1518.
- Nieuwenhuizen, N.J., Green, S.A., Chen, X., Bailleul, E.J., Matich, A.J., Wang, M.Y. and Atkinson, R.G.** (2013). Functional genomics reveals that a compact terpene synthase gene family can account for terpene volatile production in Apple. *Plant Physiology*, **161**(2): 787-804.
- Ojimelukwe, P.C. and Adler, C.** (1999). Potential of zizitaldehyde, 4-allyl-anisol, linalool, terpineol and other phytochemicals for the control of confused flour beetle (*Tribolium confusum* J.D.V) (Col., Tenebrionidae). *Journal of Pest Science*, **72**(4): 81-86.
- Omidbeygi, R.** (2007). *Production and processing of medicinal plants*. 2. Astone Qhodse Razavi Publications, Mashhad, Iran (In Persian).
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M. and Kole, C.R.** (1997). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios Journal*, **89**(358): 39-46.
- Peralta-Yahya, P.P., Zhang, F., Cardayre, S.B. and Keasling, J.D.** (2012). Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, **488**(7411): 320-328.
- Pichersky, E., Raguso, R.A., Lewinsohn, E. and Croteau, R.** (1994). Floral Scent Production in *Clarkia* (Onagraceae) (I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity). *Plant Physiology*, **106**: 1533-1540.
- Rispail, N., Nash, R. and Webb, K.** (2005). *Secondary metabolite profiling, Lopus japonicas handbook*, Section 7, Springer, Dutch.
- Rohloff, J., Skagen, E.B., Steen, A.H. and Iversen, T.H.** (2000). Production of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in Norway: essential oil content and quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(12): 6205-6209.
- Tajik, H. and Shokohi Sabet Jalali, F.** (2009). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of aqueous and alcoholic extracts of yarrow against pathogenic microorganisms. *Urmia Medical Journal*, **19**(4): 302-309 (In Persian).

Isolation of Linalool Synthase and Pinene Synthase Genes from Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Medicinal Plant

Maryam Javedan Asl¹, Hamid Rajabi Memari^{2,*}, Daryoosh Nabati Ahmadi² and Afrasiyab Rahnama Ghahfarokhi²

1- Former M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

(Received: October 05, 2014 – Accepted: March 18, 2015)

Abstract

Yarrow (*Achillea millefolium*) is an herbaceous and perennial plant species which belongs to the Asteraceae family. Yarrow's essential oil has different compounds of monoterpene and sesquiterpens, which its main constituents are pinene and linalool. These compounds have anti-microbial and anti-pest activities and also can be used in the food industry, perfumery and cosmetics. The aim of the present study was to use the degenerate primers approach in order to isolate Pinene synthase and linalool synthase genes from Yarrow plant. Up to date, there is no any report on the availability of these genes in the world gene bank. In this investigation the total RNA was extracted from Yarrow then pinene synthase and linalool synthase genes were isolated, using degenerate primers and Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR amplified two bands of 250 bp and 720 bp. The sequence data were compared with NCBI gene bank data. The results of diversity study among varieties and families based on *Pis* and *Lis* genes showed most similarity between *Achillea* and *Artemisia* plants. Also this similarity was seen between Asteraceae and Lamiaceae families and these families grouped together same group. These results also showed a relatively high similarity of *Pis* and *Lis* with some other plants which confirmed sequencing data.

Keywords: Degenerate primer, *Achillea millefolium*, Pinene synthase, Terpenes, Linalool synthase

* Corresponding Author, E-mail: memari@scu.ac.ir