

## جداسازی و همسانه‌سازی ژن ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز از گیاه رازیانه (*Foeniculum Vulgaris*)

### Isolation and cloning of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme reductase gene a from fennel (*F. Vulgaris*)

کزوان ساعد موچشی<sup>۱</sup>، علی ایزدی دربندی<sup>۱\*</sup>، حسین رامشینی<sup>۱</sup>

۱- به ترتیب دانش آموخته، دانشیاران، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

Saed Mocheshi K<sup>1</sup>, Izadi-Darbandi A<sup>\*1</sup>, Ramshini H<sup>1</sup>

1- Graduate Student, Associate professors, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aizady@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

#### چکیده

در گیاهان ترکیبات ایزوپرنوئیدی توسط دو مسیر مستقل، شامل مسیر موالونات (MVA) و مسیر ۲-*C*-متیل-D-اریترول ۴-فسفات (MEP) سنتز می‌شوند. این فرآورده‌ها برای رشد و نمو طبیعی گیاه و واکنش آن‌ها در برابر تنش‌های زیست‌محیطی مورد نیاز است. اولین مرحله در مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدهای گیاهی، تبدیل ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم<sup>A</sup> (HMG-CoA) به موالونات است؛ که توسط آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (*HMGR*) انجام می‌شود. در این تحقیق پس از تعیین نواحی حفاظتی ژن‌های هم‌خانواده آن، آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر این ژن طراحی شد. ژن *HMGR* از اکوتیپ ساری گیاه رازیانه توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به دست آمد و فرآورده حاصل از طریق همسانه سازی TA تکثیر شد. تجزیه و تحلیل بلاست نوکلئوتید (BLASTn) توالی تکثیر شده، نشان داد که این فرآورده مشابهت زیادی با سایر *HMGR* های گیاهی، به خصوص ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز گیاه آب قاشقی دارد. توالی تکثیر شده ژن *HMGR* در گیاه رازیانه دارای طولی برابر با ۱۶۶۱ جفت‌باز است و ناحیه رمز کننده‌ای به طول ۱۵۸۹ جفت‌باز (دارای دو دمن گذرنده و یک دمن کاتالیزوری) را شامل می‌شود. ناحیه ORF این توالی، رمز کننده‌ی قطعه پروتئینی به طول ۵۵۳ اسید آمینه با جرم مولکولی حدود ۵۹/۸۱۶ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۸/۴۰ بود. مدل سازی مولکولی توالی با استفاده از سرور Swiss Model نشان داد که توالی تکثیر شده، یک نوع جدید *HMGR* است که دارای یک ساختار فضایی شبیه به دیگر *HMGR* های گیاهی است و دارای تمامی دمن‌های ساختاری و کارکردی می‌باشد. با دسترسی به توالی این ژن در رازیانه، امکان بررسی الگوی بیان آن در اندام‌های مختلف، تعیین پلی مورفیسم آن در جمعیت‌های این گیاه و تولید سازه بیانی جهت انتقال ژن وجود دارد.

#### واژه‌های کلیدی

همسانه‌سازی  
ژن ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم  
A ردوکتاز  
ایزوپرنوئید  
رازیانه

و حیوان‌ها) تولید می‌شود. HMGRها در حیوان‌ها توسط یک ژن اما در گیاهان توسط یک خانواده چندژنی رمزگذاری می‌شوند که در گیاهان ایزوآنزیم‌های مختلف در طول رشد و یا در پاسخ به شرایط فیزیولوژیکی دارای بیان متفاوت هستند (Croteau et al. 2000). مناطق کاتالیزوری HMGR از سه حوزه تشکیل شده است: (۱) یک دامنه N-ترمینال شامل دو تا هفت ماریپچ آلفای عبورکننده از غشاء (در پستانداران، حشرات و قارچ‌ها هفت عدد و در گیاهان دو عدد) است، (۲) دامنه بزرگ و مرکزی L که شامل یک موتیف<sup>۸</sup> اتصال (EMPVGYV QIP) و یک موتیف اتصال به NADPH (TTEGCLVA) HMG-COA و (۳) دامنه کوچک ماریپچ S شامل یک منطقه کاتالیزوری C-ترمینال (دارای توالی حفظ شده در بین گونه‌ها) با حدود ۴۰۰ اسیدآمینو است که یک جایگاه اتصال به NADP(H) شامل یک موتیف با توالی DAMGMNM در آن جای گرفته است (Wright et al. Ruiz-Albert et al. 2002). در گیاهان، تلاش‌های زیادی در جهت افزایش بهره‌وری ایزوپرنوئیدها انجام شده است. با توجه به اینکه مطالعات گذشته ارتباط متقابل بین مسیر MVA و MEP را نشان داده است از این رو یک راهکار مشترک برای مهندسی سنتز ایزوپرنوئیدها، تمرکز بر افزایش جریان ماده و انرژی با استفاده از جداسازی ژن *HMGR* و مطالعه پیش بیان آن به منظور افزایش پیش‌ساز ایزوپنتیل‌پیروفسفات و دی‌متیل‌آلیل‌پیروفسفات است (Kanehisa et al. 2007; Hey et al. 2006; Munoz-Bertomeu et al. 2007). جداسازی و همسانه‌سازی توالی ژن *HMGR* از گیاه دارویی رازیانه، یک راهبرد ضروری در مهندسی فرایند تولید متابولیت‌های ثانویه مهم حاصل از این گیاه مانند آنتول، فنچون و لیمون هستند.

#### مواد و روش‌ها

با توجه به اینکه بیش‌ترین تولید اسانس رازیانه و متابولیت‌های ثانویه در مرحله زایشی است (Bahmani et al. 2015) از این رو به منظور استحصال بیش‌ترین مقدار mRNA از بافت گیاه، تهیه

<sup>8</sup> Motif

دو گروه اساسی از متابولیت‌ها در گیاهان شامل متابولیت‌های اولیه<sup>۱</sup> و متابولیت‌های ثانویه<sup>۲</sup> می‌باشد (Hartmann 1996). متابولیت‌های اولیه در واکنش‌ها و فرآیندهای اصلی شرکت می‌کنند اما متابولیت‌های ثانویه در برهمکنش بین گیاهان و محیط‌زیست دخالت دارند (Croteau et al. 2000). ایزوپرنوئیدها، ترکیباتی هستند که در تنفس و فتوسنتز، تبادل سیگنال بین گیاهان و محیط زیست، دفاع در برابر پاتوژن، تقسیم سلولی و تنظیم رشد، کارکرد غشاء و بیوسنتز غشاء نقش دارند (Caelles et al. 1989; Bach 1995). ترکیبات ایزوپرنوئیدی (حدود ۳۰,۰۰۰ ترکیب شناخته‌شده) و مشتقات پنج‌کربنی آن‌ها (ایزوپنتیل فسفات<sup>۳</sup> و ایزومر آن دی‌متیل‌آلیل فسفات<sup>۴</sup>) به منظور سازگاری با محیط و زنده ماندن گیاهان در شرایط محیطی ضروری است (Wang et al. 2010; Bouvier et al. 2005; Nicotra et al. 2000). مسیری موالونات (MVA) اولین بار در سال ۱۹۵۰ کشف شد که در باکتری‌ها، گیاهان، حیوان‌ها و قارچ‌ها به‌عنوان پیش‌ساز برای واحد ایزوپرن پنج‌کربنی و همچنین تولید تری‌ترین‌ها و تری‌ترین‌ها مورد نیاز است (Newman and Chappell 1999). مسیر متیل‌اریترول فسفات (MEP) تولیدکننده ماده ۲-C-متیل-D-اریتریتول-۴-فسفات در پلاستیدهاست که به‌عنوان یک منبع تولید مواد اولیه مونوترپن، دی‌ترین و تتراترپن‌ها هستند (Bestoso et al. 2006; Roberts 2007). مسیر MVA مختص یوکاریوت‌ها و مسیر MEP مربوط به پروکاریوت‌ها است اما با این وجود در گیاهان و برخی از باکتری‌های گرم مثبت (مانند استافیلوکوکوس اورئوس<sup>۵</sup> و لاکتوباسیلوس پلانتراروم<sup>۶</sup>) هر دو مسیر فعال هستند. ۳-هیدروکسی-۳-متیل‌گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR) به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز موالونات مطرح است که از پیش‌ساز ماده HMG-COAهای موجود در میتوکندری‌ها، پلاستیدها و سیتوپلاسم‌ها (در آرکوباکتری<sup>۷</sup>ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها

<sup>1</sup> First metabolites

<sup>2</sup> Secondary metabolites

<sup>3</sup> Isopentenyl pyrophosphate

<sup>4</sup> Dimethylallyl phosphate

<sup>5</sup> Staphylococcus aureus

<sup>6</sup> Lactobacillus plantarum

<sup>7</sup> Arcobacter

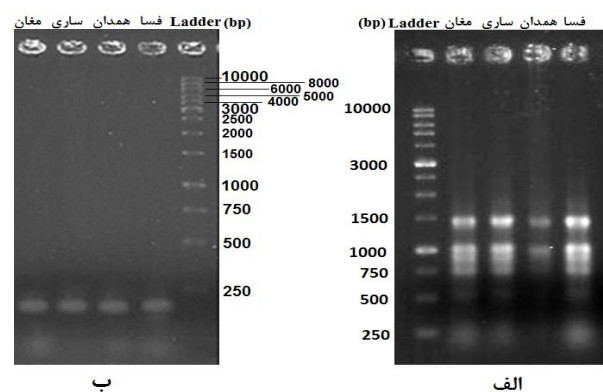
همچنین کیفیت mRNA توسط رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید<sup>۵</sup> و الکتروفورز<sup>۶</sup> در ژل آگارز<sup>۷</sup> ۱ درصد در بافر تریس بورات EDTA (TBE)<sup>۸</sup> با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت (قسمت الف شکل ۱).

با توجه به اینکه هیچ گزارشی از توالی ژن *HMGR* رازیانه در بانک‌های اطلاعاتی وجود نداشت. بنابراین جهت تعیین نواحی حفاظت‌شده، هم‌ردیفی<sup>۹</sup> توالی‌های mRNA ژن *HMGR* برگ قاشقی، جینسنگ آمریکایی<sup>۱۰</sup>، سنجی جینسینگ (جینسینگ کاذب)<sup>۱۱</sup> و جینسنگ چینی<sup>۱۲</sup> موجود در بانک اطلاعاتی NCBI<sup>۱۳</sup> (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی به آدرس [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))، توسط برنامه آنالین ClustalW (Clustal Omega Multiple Sequence Alignment) به آدرس اینترنتی <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo> انجام شد. در نهایت نقاط با بیشترین میزان هم‌ردیفی به برنامه Primer3 به منظور طراحی آغازگر داده شد و سپس آغازگر برگشت با توالی 5'CCAAGTAGGTTTCAGGCATGC3' (TM = ۵۸/۹ °C) و آغازگر رفت با توالی 5'ACTAACTGTCCCTCCCTCCT3' (TM = ۵۸/۹ °C) طراحی شدند.

ساخت رشته اول cDNA از RNA استخراجی، با استفاده از آغازگرهای رفت و الیگو dt<sub>18</sub>A(T/C/G) و از طریق واکنش رونویسی معکوس<sup>۱۴</sup> طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (ساخت شرکت سیناکلون ایران) انجام شد. جهت تایید تولید رشته اول cDNA از تکثیر ژن اکتین توسط آغازگرهای رفت (5'GGTCGCACAACCTGGTATTGTATTG3') و برگشت (5'CTCAGCAGAGGTGGTGAACA3') استفاده شد (قسمت ب شکل ۱). تکثیر قطعه مورد نظر توسط آغازگرهای طراحی شده (بر اساس نتایج هم‌ردیفی برای تکثیر ژن *HMGR* در سطح رونوشت) بر روی cDNA اکوتیپ ساری انجام شد (قسمت الف

نمونه از بافت‌های گل‌آذین و برگ‌های گیاهان رازیانه موجود در مزرعه آزمایشی و در تیرماه (هم‌زمان با دوره گلدهی گیاه) صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگ و گل‌آذین اکوتیپ<sup>۱</sup> دیررس (اکوتیپ ساری)، میان‌رس (اکوتیپ مغان) و زودرس (اکوتیپ‌های فسا و همدان) گیاه رازیانه کشت‌شده در مزرعه پژوهشی سه ساله گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد (Izadi-Darbandi et al. 2013). پس از نمونه‌برداری، بافت‌ها توسط ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منجمد شده و سپس به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

به‌منظور استخراج RNA، ابتدا مقدار ۰/۰۵ تا ۰/۱ گرم از بافت برگ و گل‌آذین هر کدام از نمونه‌ها در ازت مایع پودر شده و سپس mRNA موجود در آن با استفاده از یک میلی‌لیتر عامل ترایزول<sup>۲</sup> و طبق دستورالعمل کیت ترایزول (شرکت Invitrogen آمریکا) استخراج شد. قبل از استخراج RNA، همه شیشه‌آلات و معرف‌های مورد استفاده با استفاده از DEPC<sup>۳</sup> ۰/۱ درصد (از قبل اتوکلاو شده) تحت تیمار قرار گرفتند. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اندازه‌گیری جذب نور UV در ۲۶۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر<sup>۴</sup> (PerkinElmer Lamda 25) مشخص شد.



شکل ۱- الف: تعیین کیفیت RNAهای استخراجی با ژل آگارز ۱ درصد برای چهار لاین به ترتیب از راست به چپ فسا، همدان، ساری، مغان. ب: تأیید ساخته شدن cDNA توسط آغازگرهای اکتین برای چهار لاین به ترتیب از راست به چپ فسا، همدان، ساری، مغان.

- 1 *Ecotype*
- 2 *Trizol*
- 3 *Diethylpyrocarbonate*
- 4 *Spectrophotometer*

<sup>5</sup> *Ethidium bromide*

<sup>6</sup> *Electrophoresis*

<sup>7</sup> *Agarose gel*

<sup>8</sup> *Tris/Borate/EDTA*

<sup>9</sup> *Alignment*

<sup>10</sup> *Panax quinquefolius* (KT869137.1)

<sup>11</sup> *Panax notoginseng* (KJ804166.1)

<sup>12</sup> *Panax ginseng* (JX648390.1)

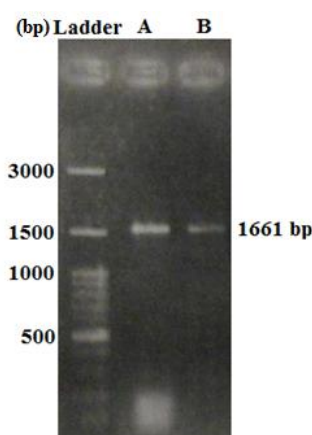
<sup>13</sup> National Center for Biotechnology Information

<sup>14</sup> *Reverse transcription*

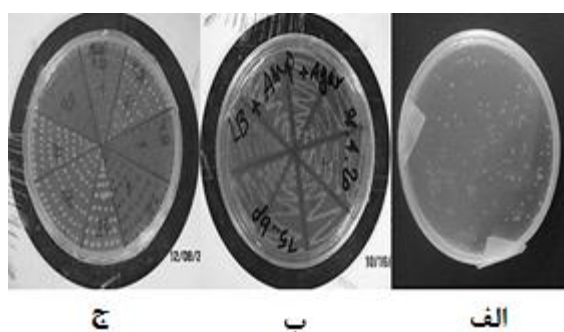
PCR ابتدا از ژل آگارز یک درصد استخراج شد و طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز به ناقل PTG-19 وارد شد و سپس به سلول‌های مستعد از باکتری اشرشیاکلی<sup>۱</sup> سویه DH5 $\alpha$  (قبلا توسط CaCl<sub>2</sub> تیمار شده) انتقال داده شد.

پس از انجام تراریختی<sup>۲</sup> باکتری، همسانه‌های تراریخته<sup>۳</sup> با کشت بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین<sup>۴</sup> مشاهده شدند (قسمت الف شکل ۳). سپس هر کدام از تک کلون‌ها بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین واکشت شدند (قسمت ب شکل ۳). تک کلون‌های واکشت شده، بر روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، X-gal<sup>۵</sup> و IPTG<sup>۶</sup> کشت شد. یکی از ویژگی‌های ناقل، دارا بودن یک جایگاه چندگانه همسانه‌سازی در وسط ژن *Lac Z* است که باعث می‌شود در صورت ورود قطعه خارجی به درون جایگاه ژن *Lac Z*، ژن آنزیم بتا گالاکتوزیداز<sup>۷</sup> غیرفعال شود. بنابراین غربالگری سلول‌های حاوی DNA نوترکیب با عدم توانایی آن‌ها در ساخت آنزیم بتا گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد و در نتیجه کلونی‌های باکتریایی تراریخته به رنگ سفید و سلول‌های باکتری غیرتراریخته به صورت آبی ظاهر می‌شوند. (قسمت ج شکل ۳). بعد از اینکه استخراج پلاسمید<sup>۸</sup> از تک کلونی‌های سفید انجام شد، نتیجه این استخراج بر روی ژل آگارز به صورت سه باند DNA سوپرکویل<sup>۹</sup>، شکسته و دو رشته‌ای مشخص شد (قسمت الف شکل ۴). به منظور تایید تکمیلی حضور قطعه مورد نظر درون پلاسمید نوترکیب از واکنش هضمی به کمک آنزیم *BamH I* استفاده شد. با توجه به این‌که آنزیم *BamH I* علاوه بر دو مکان برشی بر روی پلاسمید PTG-19 هم‌چنین دارای یک مکان برشی درون ژن *HMGR* گیاهان خانواده چتریان است، احتمال ایجاد یک باند پلاسمید خطی (bp) ۲۸۸۰ و دو باند از ژن کلون‌شده (bp) ۶۳۲ و (bp) ۱۰۲۹ قابل پیش‌بینی بود (قسمت ب شکل ۴). پس از تایید فراورده

شکل ۲). قطعه تکثیرشده مابین آغازگرهای رفت و برگشتی در حدود ۱۶۶۱ نوکلئوتید بود که در نهایت طبق دستورالعمل کیت Silica Bead DNA Gel Extraction (شرکت Thermo scientific آمریکا) از ژل آگارز یک درصد استخراج شد که به منظور تأیید استخراج ژن از ژل، بار دیگر توسط ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (قسمت ب شکل ۲).



شکل ۲- A: تکثیر ژن *HMGR* به طول ۱۶۶۱ جفت‌باز بر روی cDNA اکتیپ ساری ساخته شده‌است. B: استخراج ژن تکثیر شده از ژل آگارز ۱ درصد به وسیله کیت Silica Bead DNA Gel Ext.



شکل ۳- الف: ظهور تک کلون‌های تراریخته از باکتری ب: تکثیر تک کلون‌ها بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ج: کشت تک کلون‌ها بر روی محیط انتخابی سفید-آبی حاوی آمپی‌سیلین، IPTG و X-gal.

ابتدا ژن تکثیر شده از ژل آگارز یک درصد استخراج شد و سپس برای توالی‌یابی ارسال شد. نمونه ارسالی دارای غلظت مناسب تعیین توالی نبود، بنابراین به منظور افزایش غلظت نمونه ارسالی و تسهیل توالی‌یابی (توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت پلاسمید تکثیری) از روش همسانه‌سازی TA استفاده شد. به منظور همسانه‌سازی فراورده تکثیر شده حاصل از RT-

<sup>1</sup> E.coli

<sup>2</sup> Transformation

<sup>3</sup> Transgenic

<sup>4</sup> Ampicillin

<sup>5</sup> 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

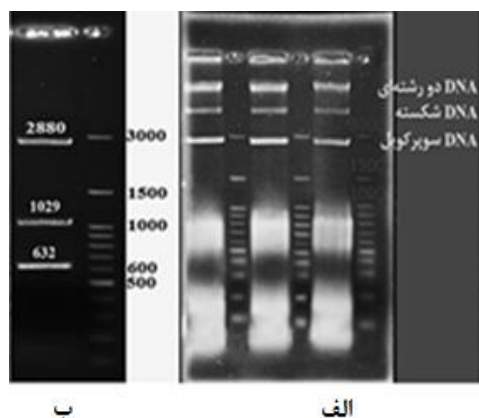
<sup>6</sup> Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

<sup>7</sup>  $\beta$ -galactosidase

<sup>8</sup> Plasmid

<sup>9</sup> Supercoiled DNA

اگرچه انتهای 3'-OH توالی به طور ناقص تکثیر شده است اما تمامی توالی دمین‌های ساختاری و کارکردی قطعه تکثیر شده کامل توالی یابی شده است. ناحیه ORF این توالی، رمزکننده قطعه پروتئینی به طول ۵۵۳ اسیدآمین است.



شکل ۴- الف: استخراج پلاسمید از کلون‌های نوترکیب سفید رنگ ب: برش پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم *BamH I* که تولید سه باند کرده است، باند اول پلاسمید خطی شده، باند دوم و سوم ژن مورد نظر که توسط برش داخلی آنزیم ایجاد شده است.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Panax quinquefolius</i>	2364	2364	100%	0.0	92%	FJ755158.2
<input type="checkbox"/> <i>Panax notoginseng</i>	2303	2303	100%	0.0	92%	KJ804166.1
<input type="checkbox"/> <i>Panax ginseng</i>	2242	2242	95%	0.0	92%	JX648390.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Centella asiatica</i>	1380	1380	51%	0.0	96%	KF925529.1
<input type="checkbox"/> <i>Morus alba</i>	315	315	62%	3e-81	72%	KX387385.1
<input type="checkbox"/> <i>Gossypium barbadense</i>	198	198	26%	3e-46	75%	DQ350143.1
<input type="checkbox"/> <i>Theobroma cacao</i>	69.4	69.4	4%	3e-07	85%	LT594795.1
<input type="checkbox"/> <i>Nilaparvata lugens</i>	60.2	60.2	2%	2e-04	95%	KC437300.1
<input type="checkbox"/> <i>Caenorhabditis elegans</i>	52.8	52.8	2%	0.028	92%	LK927698.1

شکل ۵- نتایج بلاست نوکلئوتید قطعه تکثیر شده ژن *HMGR* گیاه رازیانه.

با استفاده از نرم‌افزار Edit Seq (version 6.0) درصد هر کدام از اسیدهای آمینه توالی پروتئینی ناحیه ORF ژن *HMGR* گیاه رازیانه در جدول ۱ مشخص شده است. این ناحیه دارای جرم مولکولی در حدود ۵۹/۸۱۶ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک برابر با ۸/۴۰ (PI= 8.40) است. دو اسید آمینه هیستیدین (۲/۲۶ درصد) در ساختار ژن‌های *HMGR* به صورت حفظ شده است. یکی از این هیستیدین‌ها در بازه زمانی تبدیل HMG-CoA به مولونات پروتونه می‌شود (Liscum et al. 1985). اسید آمینه گلايسین

همسان‌سازی شده بر اساس نقشه هضمی آن، یکی از پلاسمیدها انتخاب شد و به منظور توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. از توالی آغازگر M13 رفت و برگشت خود پلاسمید به منظور توالی‌یابی استفاده شد. نتیجه توالی‌یابی در شکل ۶ نشان داده شده است.

توالی تکثیر شده از ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط نرم‌افزارهای مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور طراحی آغازگر از برنامه آنالین Primer3 (version 0.4.0) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن *HMGR* گیاه رازیانه و همچنین تعیین جرم و نقطه ایزوالکتریک پروتئین حاصل از آن، توسط نرم‌افزار Edit Seq (version 6.0) (تحت برنامه DNASTAR) انجام شد. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط دو نرم‌افزار NCBI BLASTn و ClustalW انجام شد. ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط برنامه آنالین ClustalW با سایر توالی‌های ژن *HMGR* موجود در سایت GenBank هم‌ردیف شد و سپس درخت فیلوژنیکی آن به دست آمد. نواحی گذرنده از غشا و دمین‌های درون‌غشایی موجود در ساختار ژن *HMGR* گیاه رازیانه توسط نرم‌افزار TMHMM سرور PSORTb v2.0 و TMPred تعیین شد. از نرم‌افزار Prosit motif (تحت برنامه ExpASy) به منظور تعیین نقاط حفظ شده کارکردی استفاده شد. در نهایت به منظور رسم ساختار سه‌بعدی پروتئین از نرم‌افزار Swiss Model (تحت برنامه آنالین ExpASy) استفاده شد.

## نتایج و بحث

با استفاده از نواحی حفظ شده ژن *HMGR* گیاهان خانواده چتریان، دو آغازگر دژنره رفت و برگشت برای تکثیر قسمتی از ژن *HMGR* گیاه رازیانه استفاده شد. ناحیه تکثیر شده دارای طولی برابر با ۱۶۶۱ جفت‌باز بود که شامل ناحیه بالادست کدون شروع به طول ۷۲ جفت‌باز و همچنین ناحیه رمز کننده (ORF) به طول ۱۵۸۹ جفت‌باز است. ناحیه ORF این توالی به صورت ناقص توالی‌یابی شده است و حدود ۱۸۱ جفت‌باز از انتهای ناحیه 3'-OH آن به نسبت طول کامل cDNA دیگر توالی‌های *HMGR* در سایر گیاهان خانواده چتریان، توالی‌یابی نشده است (Liu et al. 2015).

چهار مکان N- گلیکوزیلاسیون در محدوده ۳۹۴-۳۹۹ (GNYCSD)، ۴۴۸-۴۵۳ (GSAMAG)، ۴۵۶-۴۶۱ (GGFNAH)، ۴۷۴-۴۷۹ (GQDPAQ) یافت شد. هم‌ردیفی توالی پروتئینی مربوط به قطعه توالی‌یابی شده HMGR گیاه رازیانه با سه توالی پروتئینی HMGR گیاهان جنس *Panax* مانند جینسنگ آمریکایی (*Panax quinquefolius*)، جینسنگ چینی (*Panax ginseng*) و جینسنگ کاذب (*Panax notoginseng*) توسط نرم‌افزار ClustalW انجام شد و در نهایت مکان فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C، مکان فسفوریلاسیون کازئین کیناز II، مکان N- گلیکوزیلاسیون، موتیف اتصال NADP(H) و هم‌چنین موتیف اتصال HMG-CoA بر روی آن مشخص شد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت پروتئین HMGR گیاه رازیانه ممکن است توسط فسفوریلاسیون تنظیم شود.

تجزیه و تحلیل‌های TMHMM توسط سرور PSORTb v2.0 (<http://www.psorth.org/psorth/index.html>) نشان داد که پروتئین حاصل از ژن HMGR گیاه رازیانه از دو مارپیچ درون‌غشایی (در اسیدهای آمینه ۳۵-۵۷ و ۷۸-۱۰۰ از توالی پروتئین) تشکیل شده‌است (شکل ۹). بررسی توالی پروتئینی با نرم‌افزار TMPred نشان داد که نواحی 38-57، 81-97 و ۲۵۷-۲۴۰ امکان عبور از غشای سلولی را دارند (قسمت الف شکل ۱۰). همانند سایر پروتئین‌های HMGR گیاهی، پروفایل هیدروفوبی پروتئین HMGR گیاه رازیانه نشان داد که پایانه آمینوی این پروتئین نیز دارای دمین‌های درون‌غشایی است که توسط لوپ‌های آبدوست (به‌عنوان لنگر آنزیم در غشای پلاسمایی) از همدیگر جدا شده‌اند (Ruiz-Albert et al. 2002).

(۷/۷۵ درصد) نقش مهمی در پایداری ساختار دوم پروتئین HMGR دارد. از آنجا که ژن HMGR نیاز به غلظت بالایی از عوامل احیاء کننده تیول دارد؛ از این رو اسید آمینه سیستئین (۳/۰۲ درصد) در مکان فعال آنزیم دارای نقش مهمی است (Liscum et al. 1985). اسیدآمینه اسپارژین (۲/۶۴ درصد) در جایگاه گلیکوزیلاسیون اجتماع می‌یابد. درصد هر کدام از اسیدهای آمینه با بار مثبت (K, R) ۱۰/۲ درصد، اسیدهای آمینه با بار منفی (D, E) ۸/۸۸ درصد، اسیدهای آمینه آب‌گریز (A, I, L, N, C, Q, S) ۳۸/۳۷ درصد و اسیدهای آمینه آبدوست (T, Y) ۲۴/۹۵ درصد است. با توجه به اینکه آنزیم HMGR سنتز مولونات از HMG-CoA را به‌وسیله دو احیاء پی‌درپی از HMG-CoAها و با استفاده از دو مولکول NADPH (به‌عنوان کوفاکتور)<sup>۱</sup> انجام می‌دهد، از این رو با انجام هم‌ردیفی با سایر توالی‌های پروتئین HMGR گیاهی، موقعیت موتیف‌هایی با توالی اسیدآمینه حفظ‌شده مکان‌یابی شد. سه موتیف در دامنه بزرگ و مرکزی L شامل دو موتیف اتصال HMG-CoA (دارای توالی اسیدآمینه‌های EMPVGYV QIP و TTEGCLVA) و یک موتیف اتصال NADP(H) (دارای توالی اسیدآمینه GTVGGGT) است و هم‌چنین در دامنه کوچک و مارپیچ S یک موتیف اتصال به (H) NADP (دارای توالی DAMGMNM) وجود دارد که بر روی توالی ژن HMGR گیاه رازیانه مکان‌یابی شده‌است (شکل ۶). با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی پروتئین حاصل توسط نرم‌افزار Prosit motif، نواحی حفظ شده شامل یک مکان فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C در محدوده ۳۹۸-۴۰۰ (SDK)، یک مکان فسفوریلاسیون کازئین کیناز II در محدوده ۴۷۳-۴۷۶ (TGQD)،

#### <sup>۱</sup> Cofactor

جدول ۱- نسبت هر کدام از اسیدهای آمینه در توالی قطعه تکثیر شده ژن HMGR گیاه رازیانه

Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol	Amino acid	%Mol
Gln (Q)	3.78	(M) Met	2.83	(R) Arg	6.8	(I) Ile	5.48
Leu (L)	10.58	(T) Thr	4.72	(H) His	2.26	(D) Asp	3.4
Ala (A)	10.77	(G) Gly	7.75	(Y) Tyr	2.45	(V) Val	8.31
Glu (E)	5.48	(F) Phe	2.26	(N) Asn	2.64	(C) Cys	3.02
(K) Lys	3.4	(W) Trp	0.94	(P) Pro	4.72	(S) Ser	8.31

F [GAGATGCGGTTGGCCGCGGTT] CCA ATA TAT ATT TCT TTC TCT CTC CCG TCA TAC  
 TTG CCA ACC TCC ATA AAA ATG GAC GTT CCG CCG CGA TCA GTC ACT AAA ACA CTC ACG GCC  
 GGC GAA CCC CTC AAA TCA CAA AAT CAA CAC TCC TCT TCT CTC AAA GCG TCG GGT GCT CTT  
 CCT CTC CCA TTG TAT CTC ACC AAT GGC TTG TTC TCC ACC ATG TTC TTC TCA GTC ATG TAT  
 TTC CTT CTC CAT CCG TGS AGG GAG AAG ATT CCG AAT TCT GTC CCT CTC CAT GIG GGG CCC  
 CTT TCA GAA TTG GCC GCC TTG GTT TTG TTG GTT GCG TAT GTC GTT TAC GTC CIG GGA TTT  
 TTT GGG ATT GGA TTT GTC CAG TCA CCG ATC AGG CCG TCG CCG GGT AGT TGG GAG ATT CTC  
 GAA GAG GCC AAT GCC ATT CTC GAG GAA GAT CCG CCT TGC GAA CCA TGC GCA GCG GGT ATG  
 GCT TGT TCT CTT CCT CCT CCT CTC AAG ATT GTC CCG ATT GTC CCG CAA AAG CAT AAA TCA  
 GCT TTT GCG GAT GTG GTG GAG GAA CAG AAA CAA TCT GCA TCC GCA ACC ATC ATC GAC GAA  
 GAC GAG GAG ATC ATT CCG GCA GTC GTG GCG GGG ACC ACT CCT TCG TAC TCC CTC GAG TCA  
 AAA CTC GGG GAC TGC CCG CAA GCA GCT GCC ATC AGA CCG GAA GCA TTG CAG AGA ATT ACT  
 A GGA AAG TCA CTG GAC GGG CTG CCG TTG GAT GGT TTA GCT TAC GAG TCC ATT TTG GGA CAG  
 TGC TCG [GAGATGCGGTTGGCCGCGGTTACGTA] CAG ATT CCG GTG GGA ATT GCA GGG CCA TTG TTG B  
 CTT CCG GCG ACG GAG TTA TCG CTG CCA GTG CCG [ACCACA] GAA GGG TCG CTG GIG GCG AGT  
 ACT ATT CCG CGT TGT AAA GCG ATC TAT GCT TCT CGT GGC GCC ACC GGT GTA TTG TTA AGG  
 C GAT GGG AGG CCT CCG CCC CTT GTC GTT AGG ATT GGT GCT GCC TCG AGC GCC GCA GAA TGG  
 CAA TTC TTT ATG GAG GAT CCG CAGS CAT TTA GCG ACT CTT GCC CTG GTC TGT CCG AAA TCA  
 AGC AGG TGT GGA AGA TTA CAA CCA ATT CCA TGT GCA ATC GCA GGA TCG AAC TTA TAC AGG D  
 CCA TAT ACC TGC AGC ACT GCG [GATGCAATGCGAATGATG] GTT TCC AAA GGG GTC CCA  
 CAC GTC CTC GAT TAC CAT CAG CAC GAT TAT CCT GTC ATC GAC GTC ATG GGT ATT TCT GGA  
 AAT TAT TCG TCG CAT AAG AAA CCA CCA GCG GTC AAG TGG ATC GAG GGG CGT GGT AAA TCG  
 GTT GTC TGT GAG CCA ATT ATA GAG GAG GAG GTA GGG CAG AAC GTG TGG CAG ACA AAT GTG  
 GCA CCA CTG GTG GAG CTT CGT ATG CTC AAA AAT CTT ACT GCG TCA GCC ATG GGT GGT GTC  
 CTT GGC GGG TTC AAT GCC CAT GCC AGC AAT ATT GTG TCC GCG GTG TAT ACA GCC ACC GGC  
 CAA GAC CCC GCC CAA AAC ATT GAG AGC TCT CAC TGT ATC ACA AGG CTG GAA GCA GTT GGT E  
 GCT GGC AAG GAC CTT CAT ATA TCT GTC ACC ATG CCT TCC ATG GCG GTG GGG ACA GTT GGG  
 GGT GGG ACC CAA CTA GCA TCG CAG TCA [GCA TGC CTG CAC CTA CTA GGG (31=OH)] R

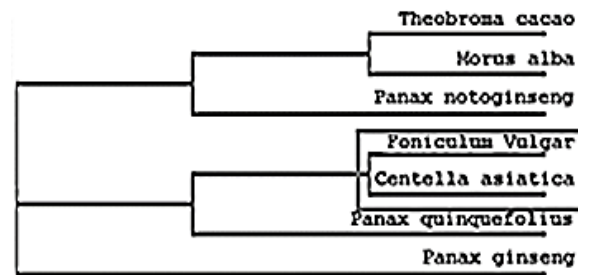
شکل ۶- نتیجه توالی‌یابی در شرکت Bioneer و زمین‌ها و نواحی اتصال آغازگر رفت و برگشت بر روی آن. A: زمین مرکزی L (EMPVGYV) B: زمین مرکزی L (TEGCLVA), C: ناحیه برشی توسط آنزیم *BamHI* D: زمین حلزونی S (DAMGMNM), E: زمین مرکزی L (GTVGGGT), F: محل اتصال آغازگر رفت R: محل اتصال آغازگر برگشت.

g11 MDVRRRSVTKTLTAGEPLKSNQHSLSLKASDALPLPLYLTLNGLFFTMFFSVMYFLLHRW  
 g13 MDVRRRPVTKTLTAGEPLKSNQHSLSLKASDAFPLPLYLTLNGLFFTMFFSVMYFLLHRW  
 g12 MDVRRRSVTKTLTAGEPLKSNQHSLSLKASDALPLPLYLTLNGLFFTMFFSVMYFLLHRW  
 g14 MDVRRRPVTKTLTAGEPLKSNQHSLSLKASDALPLPLYLTLNGLFFTMFFSVMYFLLHRW  
 \*\*\*\*\*  
 g11 REKIRNSVPLHVPLSELALVLLVASVYLLGFFGIGFVQSAIRPSPASWDILEEDNAI  
 g13 REKIRNSVPLHVPLSELALVLLVASVYLLGFFGIGFVQSVIRPSPDWDILEEDDVI  
 g12 REKIRNSVPLHVPLSELALVLLVASVYLLGFFGIGFVQSLIRPSPDWDILEEDNAI  
 g14 REKIRNSVPLHVPLSELALVLLVASVYLLGFFGIGFVQSLIRPSPDWDILEEDDVI  
 \*\*\*\*\*  
 g11 LEEDRRCEPCAAAMACSLPRLKIVRMVPOKHSAFADVVEEOKQSASATIIDEDEEIR  
 g13 LEEDSRCEPCAAAIIDCSLPPNLIKIVRMVPOKHSAFTDEVEEOKQSASATIIDKDEEIR  
 g12 LEEDSRCEPCAAAIIDCSLPPNLIKIVRMVPOKHSAFADVVEEOKQSASATIIDEDEEIR  
 g14 LEEDSRCEPCAAAIIDCSLPPNLIKIVRMVPOKHSAFADVVEEOKQSASATIIDEDEEIR  
 \*\*\*\*\*  
 g11 AVVAGTTPSYSLKSLGDCRQAAAIRREALQRITGKSLDGLPLDGLAYESILGQCCEMPV A  
 g13 AVVAGTTPSYSLKSLGDCRQAAAIRREALQRITGKSLDGLPLDGLAYESILGQCCEMPV  
 g12 AVVAGTTPSYSLKSLGDCRQAAAIRREALQRITGKSLDGLPLDGLAYESILGQCCEMPV  
 g14 AVVAGTTPSYSLKSLGDCRQAAAIRREALQRITGKSLDGLPLDGLAYESILGQCCEMPV  
 \*\*\*\*\*  
 g11 GYV [I] PVIAGPILLRATLSLVP [I] TTEGCLVA [I] STIRRCKAIYASRGATGVLLRDGRPRP B  
 g13 GYV [I] PVIAGPILLNETEYSVFM [I] TTEGCLVA [I] STNRGCKAIYASGGATSVLLRDGMTRA  
 g12 GYV [I] PVIAGPILLNETEYSVFM [I] TTEGCLVA [I] STNRGCKAIYASGGATSVLLRDGMTRA  
 g14 GYV [I] PVIAGPILLNETEYSVFM [I] TTEGCLVA [I] STNRGCKAIYASGGATSVLLKDGMTA  
 \*\*\*\*\*  
 g11 LVVIRGRASSAAEWQFFMEDFRHLATLALVCRKSSRRCGRRLQIRCAIAGSNLYRRTCTST  
 g13 FVVRFSGAKRAAELKFFLEDFMNFETLALVFNKSSRFGRLOGIKCAIAGKNLYMRFTCTST  
 g12 FVVRFSGAKRAAELKFFLEDFMNFETLALVFNKSSRFGRLOGIKCAIAGKNLYMRFTCTST  
 g14 FVVRFSGAKRAAELKFFLEDFMNFETLALVFNKSSRFGRLOGIKCAIAGKNLYMRFTCTST  
 \*\*\*\*\*  
 g11 CDAMGMNM [I] VSKGVQHVLDYHOHDY [I] PVIDVMG [I] SGNYS [I] BDK [I] KPAAVNN [I] IEGRGKSVVCEAI E  
 g13 CDAMGMNM [I] VSKGVQNVLDLFLQND [I] PPDMDVMG [I] SGNYS [I] BDK [I] KPAAVNN [I] IEGRGKSVVCEAI F  
 g12 CDAMGMNM [I] VSKGVQNVLDLFLQND [I] PPDMDVMG [I] SGNYS [I] BDK [I] KPAAVNN [I] IEGRGKSVVCEAI  
 g14 CDAMGMNM [I] VSKGVQNVLDLFLQND [I] PPDMDVMG [I] SGNYS [I] BDK [I] KPAAVNN [I] IEGRGKSVVCEAI  
 \*\*\*\*\*  
 g11 IEDEVVGVQVQTNVAALVELRMLK [I] N [I] L [I] GSAMAG [I] V [I] LGGFN [I] A [I] H [I] SNIVSAVY [I] T [I] G [I] QD [I] PACN I  
 g13 IEDEVVKKVLTNVAALVELNMLK [I] N [I] L [I] GSAVAG [I] L [I] GGFNA [I] H [I] SNIVSAVY [I] T [I] G [I] QD [I] PACN  
 g12 IEDEVVKKVLTNVAALVELNMLK [I] N [I] L [I] GSAVAG [I] L [I] GGFNA [I] H [I] SNIVSAVY [I] T [I] G [I] QD [I] PACN  
 g14 IEDEVVKKVLTNVAALVELNMLK [I] N [I] L [I] GSAVAG [I] L [I] GGFNA [I] H [I] SNIVSAVY [I] T [I] G [I] QD [I] PACN  
 \*\*\*\*\*  
 g11 IESSHCITRLEAVGAGKDLHISVTMPSMA [I] V [I] GTVGGGT [I] PLASQSACLHLL----- D  
 g13 IESSHCITMMEAVNDGRDLHISVTMPSIE [I] V [I] GTVGGGT [I] PLASQSACLHLLGKVGASRES PG  
 g12 IESSHCITMMEAVNDGRDLHISVTMPSIE [I] V [I] GTVGGGT [I] PLASQSACLHLLGKVGASRES PG  
 g14 IESSHCITMMEAVNDGRDLHISVTMPSIE [I] V [I] GTVGGGT [I] PLASQSACLHLLGKVGASRES PG  
 \*\*\*\*\*  
 g11-----  
 g13 SNSRLLASIVAGSVLAGELSLMSALAAAGLVKSHMRFNRSKDVSKLSS  
 g12 SNSRLLASIVAGSVLAGELSLMSALAAAGLVKSHMRFNRSKDVSKLSS  
 g14 PMSRLLASIVAGSVLAGELSLMSALAAAGLVKSHMRFNRSKDVSKLSS

شکل ۷- انجام هم‌ردیفی پروتئین برای توالی تکثیر شده در مقایسه با سه توالی پروتئینی HMGR از گیاهان خانواده Panax توسط نرم‌افزار Clustal W و مشخص کردن جایگاه زمین و نواحی حفظ شده کارکردی بر روی آن. (1: *Foniculum Vulgar*), (2: *Panax*), (3: *Panax notoginseng*), (4: *Panax ginseng*), (5: *Panax quinquefolius*). A: موتیف اتصال HMG-CoA (زمین مرکزی L), B: موتیف اتصال HMG-CoA (زمین مرکزی L), C: موتیف اتصال NADP(H) (زمین حلزونی S), D: موتیف اتصال NADP(H) (زمین مرکزی L), E: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون, F: جایگاه فسفریلاسیون پروتئین کیناز C, G: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون, H: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون, I: جایگاه فسفریلاسیون کازوئین کیناز II, J: جایگاه N- گلیکوزیلاسیون.



شکل ۱۱- ساختار سه‌بعدی پروتئین از توالی تکثیرشده ژن HMGR گیاه رازیانه.

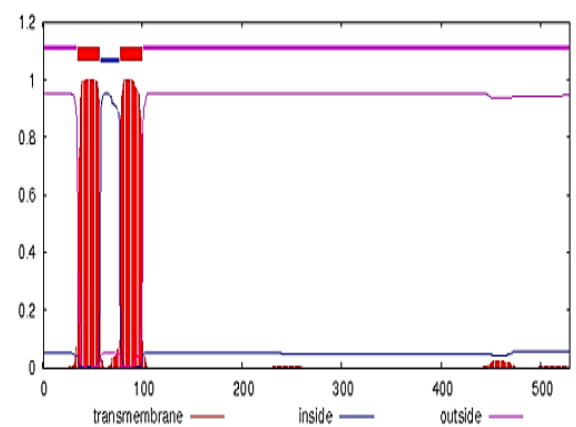


شکل ۸- تعیین درخت فیلوژنتیکی توسط هم‌ردیفی توالی تکثیرشده ژن HMGR گیاه رازیانه با توالی‌های ژن HMGR از گیاهان *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, *Panax notoginseng*, *Centella asiatica*, *Morus alba*, *Theobroma cacao*.

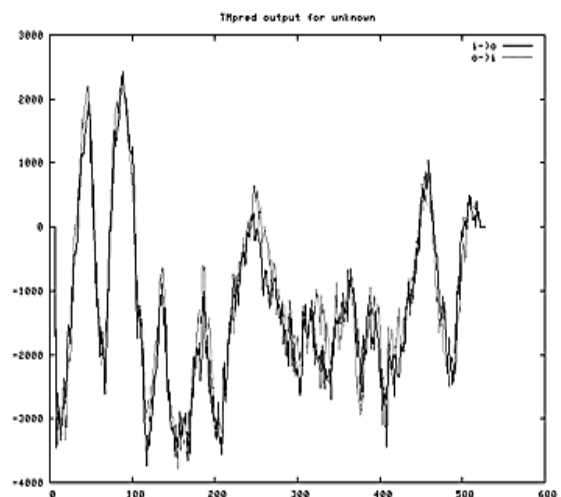
این دمین‌های درون غشایی شامل دو مارپیچ آلفا گذرنده از غشاء است (Shen et al. 2006; Wang et al. 2007) که تعداد حقیقی آن‌ها در ساختار پروتئین HMGR گیاه رازیانه باید توسط آزمایشات بعدی مشخص شود.

نتایج حاصل از بلاست نوکلئوتید توالی تکثیر شده ژن HMGR گیاه رازیانه نشان داد که توالی مرجع با توالی ژن HMGR در چهار گیاه جینسنگ آمریکایی (*Panax quinquefolius*)، جینسنگ کاذب (*Panax notoginseng*)، جینسنگ چینی (*Panax ginseng*) و آب‌قاشقی (*Centella asiatica*) دارای درصد تشابه (Identical)، ارزش مورد انتظار (E-value)، میزان همپوشانی (QueryCover) بسیار بالایی برخوردار بود (شکل ۵). میزان همپوشانی توالی مرجع با این چهار توالی به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد، ۹۵ درصد، ۵۱ درصد و میزان تشابه توالی مرجع با این چهار توالی به ترتیب ۹۲ درصد، ۹۲ درصد، ۹۲ درصد، ۹۶ درصد بود. توالی تکثیر شده ژن HMGR گیاه رازیانه بیش‌ترین تشابه را با ژن HMGR گیاه آب‌قاشقی (*Centella asiatica*) داشت که دارای درصد تشابه ۹۶ درصد بود.

هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن HMGR گیاه رازیانه با توالی نوکلئوتیدی ژن HMGR از گیاهان جینسنگ آمریکایی (*Panax quinquefolius*)، جینسنگ کاذب (*Panax notoginseng*)، جینسنگ چینی (*Panax ginseng*) و آب‌قاشقی (*Centella asiatica*)، گیاه کاکائو (*Theobroma cacao*) و توت سفید (*Morus alba*) توسط نرم‌افزار ClustalW انجام شد و سپس با



شکل ۹- پیش‌بینی مارپیچ درون غشایی (مارپیچ درون غشایی توسط خط قرمز، مارپیچ قرار گرفته در قسمت داخلی سلول توسط خط آبی و مارپیچ قرار گرفته در قسمت خارجی سلول توسط خط صورتی) مشخص شده‌است.



شکل ۱۰- نمودار شاخص آبریزی اسیدهای آمینه توالی تکثیرشده ژن HMGR گیاه رازیانه محور عمودی توسط مقیاس‌هایی با فاصله ۱۰۰۰ تقسیم‌بندی شده‌است که مقیاس مثبت نشان‌دهنده نواحی آبریز است.



با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیک و تعیین توالی قطعه تکثیر شده به‌عنوان cDNA جداسازی این قطعه بیانی از گیاه دارویی رازیانه برای اولین بار انجام شد. نتایج هم‌ردیفی نشان داد که ژن *HMGR* تکثیر شده در سطح رونوشت بیش‌ترین تشابه را با گیاه آب قاشقی (*Centella asiatica*) دارد. با توجه به حضور تمامی دمین‌های کارکردی و طول مناسب قطعه حاصل می‌توان قطعه همسانه‌سازی شده را در ناقل بیانی مناسب جهت مطالعات انتقال ژن یا بررسی‌های خاموشی ژن به‌منظور دریافت کارکرد آن به‌کار برد.

رسم درخت فیلوژنتیکی مربوط به آن‌ها مشخص شد که این توالی نوکلئوتیدی بیش‌ترین تشابه را با گیاه *Centella asiatica* و کم‌ترین تشابه را با گیاه کاکائو (*Theobroma cacao*) دارد (شکل ۸).

به‌منظور رسم ساختار سه‌بعدی پروتئین از برنامه SwissModel استفاده شد. در این برنامه با وارد کردن توالی پروتئینی قسمت ORF (چهارچوب خواندن) ژن *HMGR* گیاه رازیانه (به‌عنوان داده‌های ورودی)، در نهایت ساختار سه‌بعدی پروتئین توالی مذکور (به‌عنوان خروجی) مشخص شد (شکل ۱۱).

نتیجه‌گیری کلی

### منابع

- Bach TJ (1995) some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. *Plant Lipid Metabolism* 321-334.
- Bahmani K, Darbandi AI, Ramshini HA, Moradi N, Akbari A (2015) Agro-morphological and phytochemical diversity of various Iranian fennel landraces. *Industrial Crops and Products* 77:282-294.
- Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Degan P, Mazzei M, Cavalli F, Ledda B, Miele M (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. *BMC Biotechnology* 6:45.
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research* 44:357-429.
- Caelles C, Ferrer A, Balcells L, Hegardt FG, Boronat A (1989) Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Molecular Biology* 13:627-638.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* 24:1250-1319.
- Hartmann T (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis Applicata* 80:177-188.
- Hey SJ, Powers SJ, Beale MH, Hawkins ND, Ward JL, Halford NG (2006) Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase. *Plant Biotechnology Journal* 4:219-229.
- Izadi-Darbandi A, Bahmani K, Ramshini H, Moradia N (2013) Heritability estimates of agronomic traits and essential oil content in Iranian fennels. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15:1275-1283.
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 28:27-30.
- Liscum L, Finer-Moore J, Stroud RM, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL (1985) Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 260:522-530.
- Liu MH, Yang BR, Cheung WF, Yang KY, Zhou HF, Kwok JS, Liu GC, Li XF, Zhong S, Lee SM, Tsui SK (2015) Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in Ginsenoside and alkaloid biosynthesis. *BMC Genomics* 16:265.
- Muñoz-Bertomeu J, Sales E, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2007) Up-regulation of an N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase enhances production of essential oils and sterols in transgenic *Lavandula latifolia*. *Plant Biotechnology Journal* 5:746-758.
- Newman JD, Chappell J (1999) Isoprenoid Biosynthesis in Plants: Carbon Partitioning Within the Cytoplasmic Pathway. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 34:95-106.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science* 15:684-692.
- Roberts SC (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology* 3:387-395.
- Ruiz-Albert J, Cerdá-Olmedo E, Corrochano L (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Molecular Genetics and Genomics* 266:768-777.
- Shen G, Pang Y, Wu W, Liao Z, Zhao L, Sun X, Tang K (2006) Cloning and characterization of a root-specific expressing gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Ginkgo biloba*. *Molecular Biology Reports* 33:117-127.
- Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W (2000) Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic

fungus of *Taxus mairei*. FEMS Microbiology Letters 193:249-253.

Wang Y, Guo B, Zhang F, Yao H, Miao Z, Tang K (2007) Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

reductase from hazel (*Corylus avellana L. Gasaway*). BMB Reports 40:861-869.

Wright R, Basson M, D'Ari L, Rine J (1988) Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. The Journal of Cell Biology 107:101-114.