ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحه ۴۰۹ - ۳۹۹

جداسازی و الگوی بیان ژن β–آمیرین سنتاز در سطح رونوشت در گیاه دارویی کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

Isolation and Expression Pattern of β-amyrin Synthase in Chicory (*Cichorium intybus* L.)

ژیلا حسین پناهی[۱]، اسعد معروفی*[۱] ، بهمن بهرام نژاد[۱]

۱- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار، دانشگاه کردستان

Hossein Panahi Zh[1], Maroufi A[*1], Bahramnejad B[1]

1- Former MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, University of Kurdistan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.maroufi@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

گیاهان دارویی به‌علت داشتن ترکیبات فعال زیستی با ارزشی که اغلب دارای خواص دارویی می‌باشند، در سلامت انسان نقش به‌سزائی دارند. کاسنی (*Cichorium intybus* L.) از جمله گیاهان دارویی مهمی است که انواع متعددی از متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی مانند تری‌ترپنوئید ساپونین‌ها را تولید می‌کند. ساپونین‌ها از مهم‌ترین ترکیبات ترپنی هستند که اغلب به فرم گلیکوزیله بوده و به‌عنوان مواد با ارزش در صنعت و پزشکی کاربردهای فراوانی دارند. آنزیم β-آمیرین سنتاز[۱] یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ساپونین‌ها در گیاهان است که متعلق به گروهی از آنزیم‌های مهم کاتالیز کننده به نام اکسیدو اسکوالن سیکلازها[۱] می‌باشد. نظر به اهمیت ساپونین‌ها در گیاه کاسنی، جداسازی و بیان ژن کدکننده β-آمیرین سنتاز به‌عنوان یک ژن کلیدی مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA، سنتز cDNA، جداسازی و تعیین توالی بخشی از این ژن در گیاه کاسنی به‌طور موفقیت‌آمیزی به انجام رسید. تعیین توالی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ناحیه جدا شده نشان داد که ژن β-آمیرین سنتاز در کاسنی مشابهت زیادی با همین ژن در سایر گیاهان هم خانواده، به‌ویژه گل‌مینا و خاراگوش چینی دارد. هم‌چنین بیان ژن β-آمیرین سنتاز در سطح رونوشت به‌روش RT-PCR نیمه‌کمی در بافت‌های برگ و ریشه به‌کمک ژن رفرنس GAPDH در دو ژنوتیپ متفاوت کاسنی انجام شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز در بافت ریشه به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از بافت برگ بود. به‌علاوه بین دو ژنوتیپ در میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز در سطح رونوشت اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌تواند در تحقیقات پایه تکمیلی و هم‌چنین در راستای افزایش میزان ساپونین‌ها در کاسنی از طریق مهندسی متابولیک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

β-آمیرین سنتاز
بیان ژن
ساپونین
کاسنی

مقدمه

گیاهان دارویی شامل گیاهانی می‌باشند که اندام‌های آن‌ها مانند ریشه، برگ و ساقه حاوی ترکیبات فیتوشیمیایی هستند که اغلب دارای خاصیت دارویی بوده و برای استفاده انسان مفید می‌باشند. بیش‌تر این ترکیبات فیتوشیمیایی، کاربردهای فراوانی در صنعت داروسازی دارند. اگر چه استفاده از داروهای شیمیایی صنعتی در بسیاری از موارد ضروری می‌باشد، اما مصرف داروهای گیاهی نسبت به آن‌ها کم‌خطرتر بوده و بنابراین از درجه سلامتی بیش-تری برخوردارند. داروهای گیاهی حاصل تبدیل فراورده‌های فیتوشیمیایی (متابولیت‌های ثانویه) برخی گیاهان به دارو در کارخانه‌های داروسازی طی فرآیندهایی خاص و استریل هستند. امروزه بسیاری از داروهای جدید از محصولات طبیعی گیاهی (متابولیت‌های ثانویه) و یا از ترکیبات مشتق شده از آن‌ها ساخته می‌شوند (Li and Vederas 2009). در دهه‌های اخیر بیش از ۹۰ درصد داروهای شیمیایی جدید از محصولات طبیعی تهیه شده است (Hu and Xu 2009). به‌عنوان مثال در حدود ۹۰ درصد داروهای ضدسرطان از محصولات طبیعی به‌دست آمده از گیاهان ساخته شده‌اند (Qi et al. 2006). بنابراین به دلیل اهمیت و کاربرد قابل توجه متابولیت‌های ثانویه حاصل از گیاهان دارویی، به نظر می‌رسد که شناسایی و استخراج آن‌ها در گیاهان مختلف رو به افزایش باشد. متابولیت‌های ثانویه گیاهی آن دسته از ترکیبات آلی هستند که مستقیماً در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند و دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌تری نسبت به متابولیت‌های اولیه می‌باشند. آلکالوئیدها (مورفین، کدئین، آتروپین)، ترپنوئیدها[1]، فلاونوئیدها[2]، رنگیزه‌ها و تانن‌ها[3] از جمله مهم‌ترین این ترکیبات به‌شمار می‌آیند. اگر چه متابولیت‌های ثانویه گیاهی بسیار متنوع هستند، اما هر گیاهی قادر به تولید هر نوع ترکیب ثانویه‌ای نیست و برخی ترکیبات تنها منحصر و محدود به گونه یا گونه‌های خاصی هستند (Crozier et al. 2006). به‌علاوه میزان تولید آن‌ها اغلب بسیار کم است. اهمیت متابولیت‌های ثانویه برای گیاهان از ماهیتی اکولوژیکی و فیزیولوژیکی برخوردار است و این ترکیبات دارای کارکردهای متنوعی هستند. به‌عنوان مثال می‌توان به عملکرد دفاعی در برابر اشعه مضر UV، انگل‌ها، عوامل بیماری‌زا و جذب گرده‌افشان‌ها اشاره کرد. هم‌چنین برخی از ترکیبات ثانویه مانند هورمون‌های گیاهی در گیاهان دارای عملکرد پیام-رسانی هستند به‌طوری‌که علائم خارجی را به پاسخ‌های سلولی مرتبط می‌سازند (Wink 2010).

کاسنی به‌عنوان یک گیاه دارویی، از گذشته‌های دور در بین مردم کشورهای مختلف شناخته شده‌است. مطالعات جدید خواص ضددیابتی و ضدسرطانی را برای این گیاه نشان می‌دهند (Ghannadi et al. 2011). کاسنی متعلق به خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) است و بومی مدیترانه و مناطق معتدل و گرمسیر آسیا و شمال آفریقا می‌باشد (Munoz 2004). ارتفاع این گیاه بین ۱۰۰-۱۵ و گاهی تا ۱۵۰ سانتی‌متر می‌رسد، دارای ساقه‌ای باریک و توخالی، افراشته، استوانه‌ای شکل و خشبی است که شاخه‌هایی از آن منشعب می‌شوند. در کاسنی ماده شیری رنگی به‌نام «شیکورین»[4] وجود دارد که دارای طعمی تلخ بوده و به محض قطع ساقه از وسط آن ترشح می‌شود. کاسنی وحشی[5] خودرو و چندساله می‌باشد (Van Cutsem et al. 2003). دو فرم اهلی شده این گیاه به نام‌های کاسنی سالادی و ریشه‌ای نیز وجود دارند که دو ساله می‌باشند. ارقام سالادی[6] به‌خاطر برگ‌هایشان برای تهیه سالاد کشت می‌شوند و ارقام ریشه‌ای[7] نیز به عنوان جایگزین قهوه و یا افزودنی و هم‌چنین برای استخراج اینولین (یک پلی‌مر قندی با ارزش) کشت می‌شوند (Hill 1987; De Bruyn et al. 1992). به‌علاوه بعضی از ارقام کاسنی به‌طور وسیعی در کشورهایی مانند آمریکا، هند و نیوزیلند به‌عنوان یک گیاه علوفه-ای برای تغذیه دام کشت می‌شوند (Barry 1998).

به‌دلیل وجود ترکیبات فیتوشیمیایی متنوع در کاسنی و اهمیت آن‌ها در سلامتی انسان، محصولات طبیعی بسیاری از این گیاه تولید شده‌اند که به‌عنوان داروهای طبیعی، نوشیدنی‌های سالم و افزودنی‌های غذایی به کار می‌روند (Wang and Cui 2009). یکی از ترکیبات مهم موجود در این گیاه، ساپونین‌ها یا گلیکوزیدهای

[1] Triterpenoids
[2] Flavonoids
[3] Tannins

[4] Cichorin
[5] *C. intybus* L. var. *silvestre*
[6] *C. intybus* L. var. *foliosum*
[7] *C. intybus* L. var. *sativum*

تری‌ترپنوئیدی هستند. ساپونین از کلمه لاتین sapo به‌معنای صابون گرفته شده، که نشان دهنده خواص کف کنندگی آن در ترکیب با محلول آبی است (Haralampidis et al. 2002). مهم‌ترین تری‌ترپن ساپونین‌های یافت شده در گیاهان عالی از نوع اولئان[1] (β-آمیرین)، اورسان[2] (α-آمیرین) و داماران[3] (دامارندیول) (دامارندیول) هستند که معمول‌ترین نوع آن تری‌ترپن‌های نوع اولئان است که در گیاهان مختلفی همچون جینسینگ[4]، یوکا، شاه بلوط هندی، عشقه بیابانی، شیرین بیان، کاسنی، لوبیا و گیاهان علفی با اسامی‌ای که نشان‌دهنده خواص کف آوری آن‌هاست، مانند غاسول صابونی[5]، بندق[6]، درخت صابون[7] و ریشه صابون[8] صابون[8] یافت شده و در طب سنتی فرهنگ‌های مختلف، برای پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلفی به‌کار گرفته می‌شوند (Shibuya et al. 2009). از خانواده گل ستاره‌ای‌ها نیز چندین تری‌ترپنویید ساپونین از گونه *Aster spp* جدا شده‌است. دو مورد از این ترکیبات در گونه *Aster lingulatus* یافت می‌شوند که در مهار سنتز DNA در بیماری سرطان خون نقش دارند. به‌طور کلی این کلاس از متابولیت‌ها دارای تنوع ساختاری و فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی هستند که بیش‌تر در بعضی از گونه‌های متعلق به گل ستاره‌ای‌ها یافت می‌شوند (Cammareri et al. 2008).

با توجه به اهمیت نقش ساپونین‌ها به‌عنوان ترکیبات با ارزش دارویی لازم است که مطالعات بیش‌تری از نقطه نظر ژنتیکی و ملکولی به‌منظور آشکارسازی مسیر بیوسنتزی آن‌ها صورت گیرد. یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در مسیر تولید ساپونین‌ها β-آمیرین سنتاز می‌باشد که نقش مهمی در بیوسنتز این ترکیبات دارد و نقطه هماهنگ کننده بین متابولیت اولیه (استرول) و متابولیت ثانویه (تری‌ترپن ساپونین) در این مسیر بیوسنتزی است. بنابراین داشتن اطلاعات ژنتیکی و ملکولی برای درک مکانیسم و چگونگی تنظیم و بیان ژن β-آمیرین سنتاز و تاثیر آن بر مقدار تری‌ترپنهای ساپونینی در کاسنی ضروری به نظر می رسد. در نتیجه، به عنوان اولین گام در راستای مطالعات ژنتیکی ومولکولی جهت افزایش ساپونین‌ها، در این تحقیق ابتدا بخشی از ژن کد کننده β-آمیرین سنتاز (BAS) شناسایی و بیان آن در سطح رونوشت در بافت‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف کاسنی مورد بررسی قرار گرفت. طبق اطلاعات موجود این اولین پژوهش در راستای شناسایی ژن β-آمیرین سنتاز و بررسی بیان آن در مسیر بیوسنتز تری‌ترپن ساپونین‌ها در کاسنی می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق می تواند در جهت افزایش تولید ساپونین‌ها از طریق β-آمیرین سنتاز به عنوان یک ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز ساپونین‌ها به کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

بذور ارقام زراعی هیرا[9] و یک ژنوتیپ بومی کردستان به‌ترتیب از موسسه تحقیقات کشاورزی و شیلات[10] بلژیک و بانک ژن گیاهی ایران دریافت شد. این بذور در بهار سال ۱۳۹۲ در شرایط گلخانه کشت شدند و پس از رشد کامل گیاهان، RNA کل با روش تک مرحله‌ای مبتنی بر گوانیدیوم (Piotr and Sacchi 2006) با اندکی تغییرات از بافت‌های ریشه و برگ استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA به‌ترتیب با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد و دستگاه نانودرآپ مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز cDNA از آغازگر Oligo (dt) و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (M-MuLV RT[11]) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Vivantis) استفاده شد.

به‌منظور طراحی آغازگر و انجام واکنش RT-PCR ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی β-آمیرین سنتاز در پایگاه اطلاعاتی NCBI[12] جستجو شد و توالی‌ها با فرمت FASTA مربوط به چندین گونه از خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها و نیز چند خانواده گیاهی دیگر دریافت شد. برای بررسی نواحی حفظ شده بین توالی‌های ژن‌های کد کننده β-آمیرین سنتاز در گونه‌های مختلف گیاهی از نرم‌افزار Clustal Omega استفاده شد (Sievers et al. 2011). سپس جفت آغازگرهای اختصاصیBAS1 (جدول ۱) از روی نواحی کاملاً

[1] Oleanane
[2] Ursane
[3] Dammarene
[4] *Panax ginseng*
[5] Soapwort
[6] Soapberry
[7] Soapbark
[8] Soap root

[9] Hera' Root type cultivar (*C. intybus* var. *sativum*)
[10] Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO)
[11] *Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
[12] www.ncbi.nlm.nih.gov

حفظ شده این ژن‌ها طراحی و از جهت خصوصیات ترمودینامیکی و مولکولی با نرم‌افزار Primer Express Software v3.0.1 مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به این‌که برای این ژن در گونه‌های مختلف مناطق کاملاً حفاظت شده‌ای وجود داشت، بنابراین آغازگرهای اختصاصی طراحی شد و در نتیجه نیازی به استفاده از آغازگرهای دژنره و به دنبال آن PCR آشیانه‌ای نمی‌باشد. با توجه به نتایج هم‌ردیفی بین ژن‌ها، انتظار می‌رود که این جفت آغازگر طراحی شده محصولی به طول ۵۸۱ جفت‌باز را تکثیر کند. ترکیبات واکنش PCR شامل بافر با غلظت 10x، cDNA (حدود ۱۰۰ نانوگرم)، $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، dNTP ۱۰ میلی‌مولار، آغازگرهای مستقیم و معکوس (5 pmol/µl)، آنزیم DNA پلی‌مراز[1] در حجم ۲۰ میکرولیتر و واکنش PCR به صورت: واسرشت اولیه در ۹٤°C به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت در ۹٤°C به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در ۵۸°C به مدت ۵۰ ثانیه و بسط در ۷۲ °C به مدت ۵۰ ثانیه بود.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده جهت جداسازی وآنالیز بیان ژن β-آمیرین سنتاز در کاسنی

نام آغازگر	توالی آغازگر (′۳ → ′۵)
BAS1-F	AACATGGCTTTCGATACTTGG
BAS1-R	GACTGCCGAAACTCTGCATT
GAPDH-F	TCGGGATCAACGGGTTTGGAAG
GAPDH-R	CTCTCCAGTCCTTGCTTGATGGTC
BAS2-F	TCAACTGGAAGAGCATACGAC
BAS2-R	GACTGCCGAAACTCTGCATT

همسانه‌سازی محصول PCR در ناقل[2] pTG19-T (Vivantis) با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (Vivantis) مطابق روش توصیه شده شرکت سازنده انجام شد. پس از تهیه سلول مستعد[3] باکتری *E. coli* سویه DH5α به روش قلیایی کلرید کلسیم (Sambrook and Russell 2001)، ناقل‌ها (شامل نوترکیب و غیر نوترکیب) با استفاده از روش فیزیکی شوک حرارتی به باکتری‌های مستعد انتقال داده شد. پس از کشت، باکتری‌های تراریخت از غیرتراریخت با استفاده از آزمون کلنی‌های سفید و آبی شناسایی شدند. در مرحله بعد پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر به روش قلیایی استخراج شدند (Sambrook and Russell 2001). برای تایید همسانه‌سازی، PCR با آغازگرهای یونیورسال M13 صورت گرفت، که انتظار می‌رود که قطعه‌ای به طول ۷۷٤ جفت‌باز تکثیر شود. در نهایت پلاسمیدهای نوترکیب توسط شرکت بایونیر (Bioneer) کره جنوبی توالی‌یابی شدند.

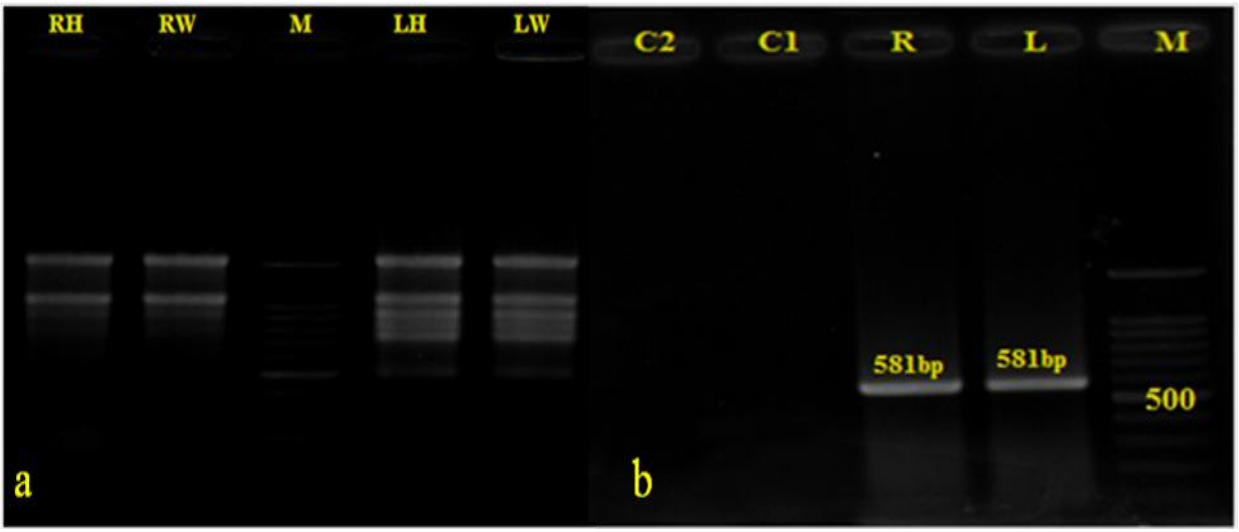
برای یافتن توالی‌های مشابه ابتدا در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از هم‌ردیفی به روش Blastx جستجو انجام شد. با توجه به نتایج هم‌ردیفی بین توالی به‌دست آمده از کاسنی با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، گونه‌هایی که شباهت زیادی را نشان دادند، شناسایی شدند. سرانجام با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer 7.5 (http://www.clcbio.com) ناحیه حفاظت شده توالی پروتئینی گونه‌های مذکور مشخص شد و در نهایت درخت فیلوژنی بر اساس ناحیه تعیین توالی شده ژن β-آمیرین سنتاز با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 (Sudhir et al. 2008) به روش نزدیک‌ترین همسایگی[4] و با بوت استرپ[5] ۱۰۰ رسم شد.

بیان ژن β-آمیرین سنتاز در سطح رونوشت به روش RT-PCR نیمه‌کمی در بافت‌های ریشه و برگ برای رقم هیرا و ژنوتیپ بومی کاسنی کردستان بررسی شد. از آغازگرهای جدید (BAS2) برای آنالیز بیان ژن β-آمیرین استفاده شد. این جفت آغازگر با توجه به نتیجه تعیین توالی قطعه β-آمیرین سنتاز جدا شده در کاسنی طراحی شدند و قطعه‌ای به طول ۳۰۰ جفت‌باز را تکثیر می کنند (جدول ۱). هم‌چنین از ژن خانه دار گلیسر آلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. RNA از گیاهان بالغ برای بررسی بیان ژن استخراج شد و غلظت‌های RNA همسانه‌سازی و cDNA سنتز شد. واکنش RT-PCR برای ژن کنترل داخلی (GAPDH) و ژن هدف (BAS) به صورت هم‌زمان انجام شد. شرایط زمانی و دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۹٤°C به مدت پنج دقیقه برای واسرشت اولیه و سپس ۲۹ چرخه به صورت: واسرشت ۵۰ ثانیه در ۹٤°C، اتصال

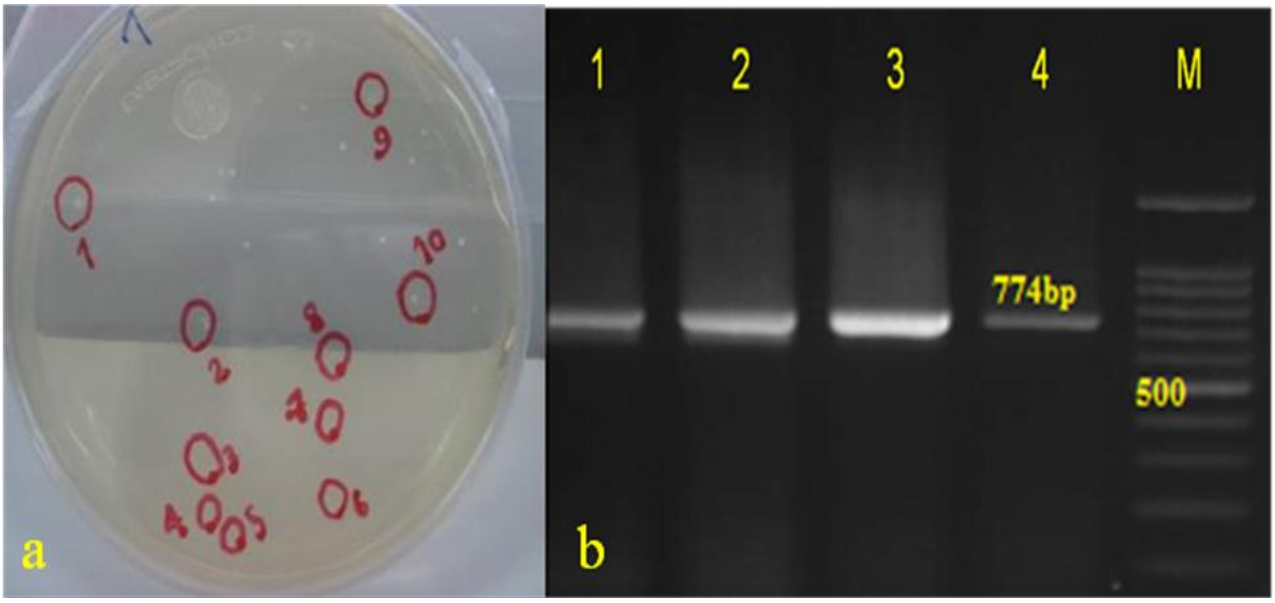
[1] Taq DNA Polymerase
[2] Vector
[3] Competent cell
[4] Neighbor-joining
[5] Bootstrap

۵۰ ثانیه در ۵۸°C، بسط ۵۰ ثانیه در ۷۲°C و سرانجام بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲°C بود که این تعداد چرخه پس از انجام آزمایشات بهینه‌سازی به‌دست آمد (Martin et al. 2009). از محصولات RT-PCR بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، عکس تهیه شد.

سپس تصاویر حاصل از محصولات RT-PCR نیمه کمی با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET، به‌صورت کمی درآمد و داده‌های حاصل تجزیه واریانس شدند. سرانجام نمودار نمایش نسبی بیان ژن به کمک نرم‌افزار MATLAB R2009a رسم شد.



شکل ۱- استخراج RNA از بافت‌های مختلف ریشه و برگ گیاه کاسنی (a)، RH) ریشه رقم هیرا، RW) ریشه ژنوتیپ بومی، LH) برگ رقم هیرا، LW) برگ ژنوتیپ بومی، M) اندازه نما یا مارکر DNA. قطعه تکثیر شده به‌طول حدود ۶۰۰ جفت‌باز با آغازگرهای طراحی شده (BAS1) با استفاده از واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز (b)، L) برگ، R) ریشه، C1) کنترل منفی با RNA برای بافت برگ، C2) کنترل منفی با RNA برای بافت ریشه.



شکل ۲- همسانه‌های تراریخت بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین (a)، PCR قطعاتی به طول ۷۷٤ جفت باز از پلاسمیدهای pTG19-T همسانه‌سازی شده به کمک آغازگرهای M13 به‌منظور تایید نوترکیبی آن‌ها (b). M) اندازه نمای DNA و ستون‌های ۱ تا ٤ پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از چهار استخراج متفاوت می‌باشند.

```
aacatggctttcgatacttggtgtgtgcgagtgggcaggaaccaacccaatgccgcccgag
 T  W  L  S  I  L  G  V  C  E  W  A  G  T  N  P  M  P  P  E
ttttggatcctgccttctttccttcctatgtacccagcgaaaatgtggtgctattgtcgg
 F  W  I  L  P  S  F  L  P  M  Y  P  A  K  M  W  C  Y  C  R
ttggtatatatgccaatgtcatacctatatggaaagagatttgtgggccctattactcct
 L  V  Y  M  P  M  S  Y  L  Y  G  K  R  F  V  G  P  I  T  P
ttgattctcgaacttagagatgaactttatttacagccatacaatgagatcaactggaag
 L  I  L  E  L  R  D  E  L  Y  L  Q  P  Y  N  E  I  N  W  K
agcatacgacatttgtgtgcgaaggaagatttatattatcctcatccattactgcaagat
 S  I  R  H  L  C  A  K  E  D  L  Y  Y  P  H  P  L  L  Q  D
ttaatgtgggatggtttatatatttgcaccgagcctttactaaatcgctggccgcttaat
 L  M  W  D  G  L  Y  I  C  T  E  P  L  L  N  R  W  P  L  N
aaattgcgccagaaagcactcaagacaacaatggaacatatccattatgaagatgagaac
 K  L  R  Q  K  A  L  K  T  T  M  E  H  I  H  Y  E  D  E  N
agtcgatatatcacaattggttcggtggaaaaggctttgtgcatgcttgcatgttgggtt
 S  R  Y  I  T  I  G  S  V  E  K  A  L  C  M  L  A  C  W  V
gaagatccaaatggggtttgctttaaaaggcatattgcccgaatcccggattatatctgg
 E  D  P  N  G  V  C  F  K  R  H  I  A  R  I  P  D  Y  I  W
gttgcagaagatggaatgaaaatgcagagtttcggcagtc
 V  A  E  D  G  M  K  M  Q  S  F  G  S
```

شکل ۳- توالی DNA و ترجمه اسید آمینه‌ای قطعه کلون شده ژن β-آمیرین سنتاز در کاسنی

نتایج

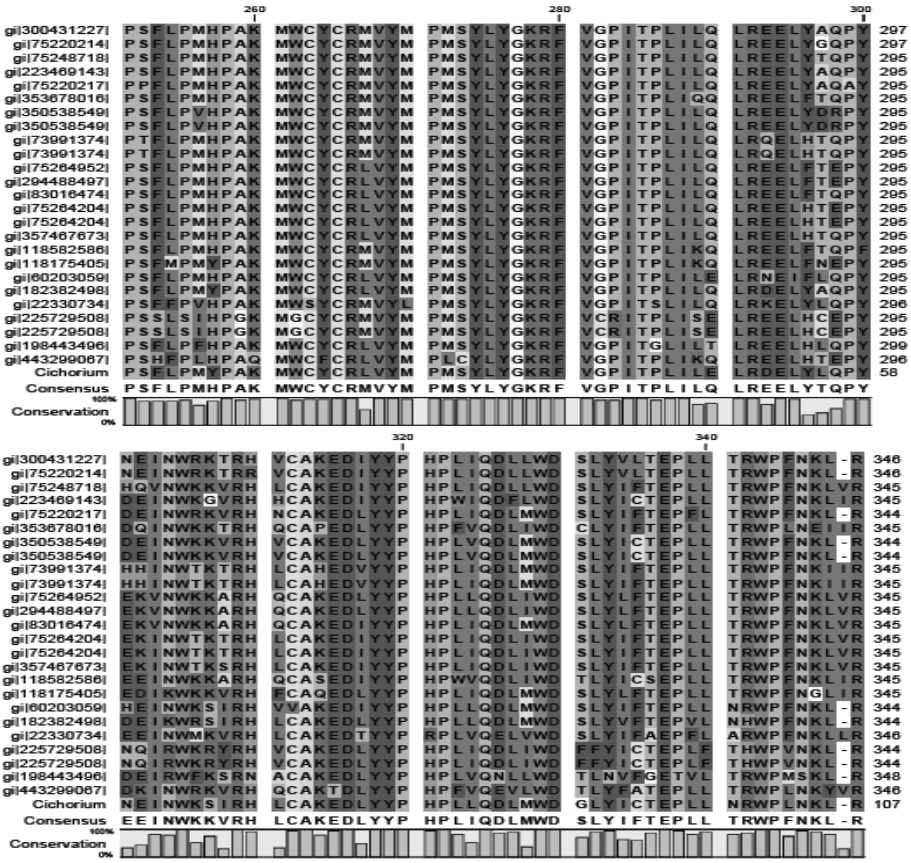
استخراج RNA کل با کمیت و کیفیت مناسب از بافت‌های برگ و ریشه رقم زراعی هیرا و ژنوتیپ بومی کردستان انجام شد (شکل ۱a) و سپس cDNA سنتز شد. در واکنش RT-PCR جفت آغازگر طراحی شده BAS1 (جدول ۱) بر طبق انتظار قطعه‌ای به طول ۵۸۱ جفت‌باز را در کاسنی تکثیر کرد (شکل ۱b). وضوح باندها و هم‌چنین عدم وجود اسمیر و چندباندی دلیلی بر تکثیر مناسب می‌باشد.

در مرحله بعد ابتدا همسانه‌سازی قطعه حاصل از RT-PCR ژن β-آمیرین سنتاز در وکتور pTG19-T و سپس تراریختی باکتری-های مستعد انجام شد. باکتری‌های تراریخت حاوی پلاسمید نوترکیب بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک مشاهده شدند (کلنی‌های آبی، شکل ۲a). هم‌چنین نوترکیبی پلاسمیدهای استخراج شده با واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی M13 تایید شد (شکل ۲b). در مرحله بعدی پلاسمید نوترکیب pTG19-T توسط شرکت بیونر تعیین توالی شد. خوانش برای توالی‌یابی در دو جهت مستقیم و معکوس انجام شد و سرانجام ترادف قطعه کلون شده بدست آمد (شکل ۳).

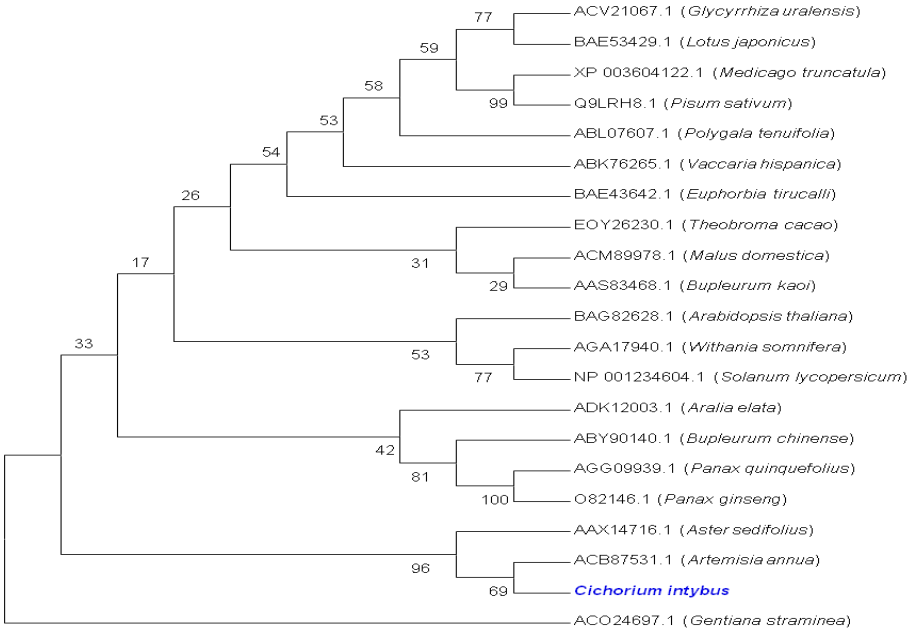
نتایج Blastx از پایگاه اطلاعاتی NCBI (جدول ۲) نشان داد که توالی اسیدآمینه‌ای قطعه کلون شده در کاسنی با توالی‌های اسیدآمینه‌ای β-آمیرین سنتاز از چندین گونه گیاهی مشابهت خیلی زیادی دارد که اکثر آن‌ها گونه‌های وابسته به تیره گل‌ستاره-ای‌ها می‌باشند. هم‌ردیفی چندگانه و میزان حفظ شدگی توالی‌های اسیدآمینه این ناحیه از β-آمیرین سنتاز در کاسنی با چند گونه گیاهی با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer 7.5 در شکل ٤ نشان داده شده‌است. نتایج هم‌ردیفی چندگانه بین توالی پروتئینی به‌دست آمده از کاسنی و β-آمیرین سنتاز در گونه‌های مختلف گیاهی نشان داد که در موقعیت‌های زیادی حفظ شدگی وجود دارد (شکل ٤). در نهایت جهت تعیین جایگاه فیلوژنتیکی بر اساس توالی β-آمیرین سنتاز به‌دست آمده در کاسنی، دندروگرام رسم شد (شکل۵). نتایج نشان داد که سه گونه گیاهی کاسنی، گل‌مینا و خاراگوش چینی (*Artemisia annua*) در یک خوشه قرار دارند که دارای توالی‌های بسیار مشابهی برای ژن β-آمیرین سنتاز هستند. در واقع گیاهانی که با بوت استرپ بالایی در کنار هم قرار گرفته‌اند، بیش‌تر مربوط به یک خانواده می‌باشند (شکل۵). این نتایج نشان می دهد که توالی به‌دست آمده در کاسنی می‌تواند متعلق به ژن β-آمیرین سنتاز باشد. به‌منظور درک بیش‌تر از میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز در بافت‌های مختلف گیاه کاسنی از روش RT-PCR نیمه کمی استفاده شد.

جدول ۲- نتایج حاصل از Blastx برای توالی ژن β-آمیرین سنتاز جدا شده از گیاه کاسنی

گونه گیاهی	ارزش E	درصد یکسانی	شماره دسترسی
Artemisia annua	2e-114	90%	ACB87531.1
Aster sedifolius	2e-112	87%	AAX14716.1
Bupleurum chinense	3e-110	83%	ABY90140.1
Withania somnifera	2e-08	85%	AGA17940.1
Aralia elata	8e-108	85%	ADK12003.1
Solanum lycopersicum	1e-107	85%	NP_0012 34604.1
Panax quinquefolius	6e-106	84%	AGG09939.1
Panax ginseng	1e-105	84%	O82146.1
Theobroma cacao	3e-104	83%	EOY26230. 1
Malus domestica	8e-104	81%	ACM89978.1
Euphorbia tirucalli	5e-102	81%	BAE43642.1
Lotus japonicus	6e-102	81%	BAE53429.1
Vaccaria hispanica	7e-102	79%	ABK76265.1
Medicago truncatula	5e-100	79%	XP_003604122.1
Glycyrrhiza uralensis	7e-100	80%	ACV21067.1
Polygala tenuifolia	1e-98	77%	ABL07607.1
Gentiana straminea	6e-95	77%	ACO24697.1
Arabidopsis thaliana	2e-94	76%	BAG82628.1
Bupleurum kaoi	4e-101	80%	AAS83468.1
Pisum sativum	4e-101	80%	Q9LRH8.1



شکل٤- نواحی حفظ شده توالی‌های β-آمیرین سنتاز در چند گونه گیاهی

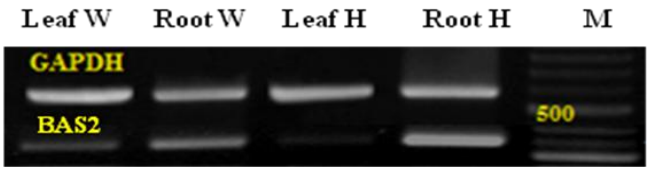


شکل ۵- دندروگرام حاصل از توالی پروتئینی β-آمیرین سنتاز برای کاسنی و چندین گونه گیاهی به روش نزدیک‌ترین همسایگی

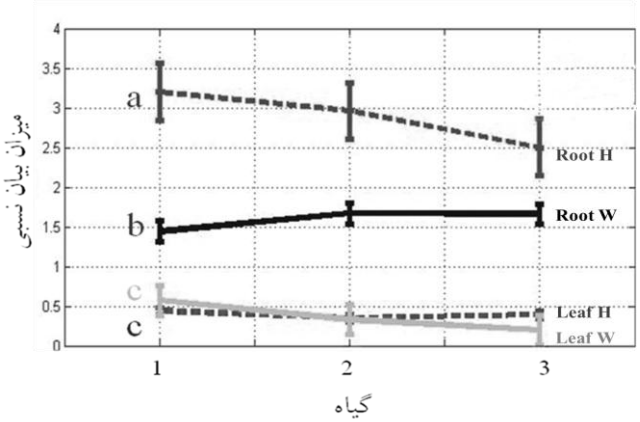
RNA از ریشه و برگ‌های بالغ سه گیاه متفاوت از هر دو رقم هیرا و ژنوتیپ بومی کردستان استخراج شد، همسان‌سازی غلظت‌های RNA، ساخت cDNA و RT-PCR نیمه کمی (شکل ٦) با موفقیت به انجام رسید. نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET به داده‌های کمی تبدیل شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز در سطح رونوشت در بافت ریشه رقم هیرا اختلاف معنی-داری با برگ در رقم هیرا و نیز ریشه و برگ ژنوتیپ بومی کردستان دارد، اما اختلاف معنی‌داری بین میزان بیان در برگها در رقم هیرا و ژنوتیپ بومی مشاهده نشد (شکل ۷). هم‌چنین میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز در سطح رونوشت در ریشه رقم هیرا بیش‌تر از میزان آن در ریشه ژنوتیپ بومی بود. به‌طورکلی نتایج بیان ژن در سطح رونوشت، نشان می‌دهد که میزان بیان در بافت ریشه نسبت به برگ به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر است (شکل ۷).

بحث

به‌دلیل اهمیت ساپونین‌ها در داروسازی و کاربردهای متنوع آن‌ها در صنعت، ضروری است که اطلاعات کامل و جامع مولکولی از ژن‌های مهم دخیل در بیوسنتز آن‌ها فراهم شود. با توجه به این‌که کاسنی یکی از گیاهان حاوی ترکیبات با ارزش ساپونینی است، بنابراین اطلاعات مولکولی مرتبط با بیوسنتز آن می‌تواند کمک قابل توجهی در راستای افزایش این ماده با ارزش در اختیار قرار دهد. چون ترکیب β-آمیرین که توسط آنزیم β-آمیرین سنتاز کاتالیز می‌شود یک پیش ماده کلیدی برای بیوسنتز اکسیدو-اسکوآلن است که خود یکی از پیش ماده‌های اصلی در بیوسنتز تری‌ترپن ساپونین‌ها می‌باشد، بنابراین با در دست داشتن اطلاعات ژنتیکی در مورد ژن کلیدی β-آمیرین سنتاز می‌توان در جهت افزایش ساپونین‌ها در کاسنی اقدام کرد. در راستای این هدف در این تحقیق توالی‌یابی بخشی از ژن β-آمیرین سنتاز و میزان بیان نسبی آن در سطح رونوشت مورد توجه قرار گرفت. ابتدا با طراحی آغازگرهای اختصاصی که با الگو قرار دادن توالی ژن‌های گونه‌های خویشاوند نزدیک به کاسنی انجام گرفت، قطعه کاملاً تک باندی اختصاصی با اندازه پیش‌بینی شده تکثیر شد.



شکل ٦- RT-PCR نیمه‌کمی ژن β-آمیرین سنتاز به کمک ژن کنترل داخلی GAPDH در رقم هیرا (H) و ژنوتیپ بومی کردستان (W). M) اندازه نمای DNA.



شکل ۷- میزان بیان نسبی ژن β-آمیرین در سطح رونوشت در سه تکرار در بافت‌های ریشه و برگ در رقم هیرا (H) و ژنوتیپ بومی کردستان (W). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد است.

این نتیجه نشان می‌دهد که با الگو قرار دادن اطلاعات ژنتیکی گونه‌های خویشاوند نزدیک به گونه مورد نظر، می‌توان اقدام به تکثیر قطعات رونوشت ژن‌های ناشناخته کرد. هر چند که اندازه قطعه تکثیر شده اولین نشانه از صحیح بودن روند مطالعه است اما دلیل کافی برای صحت آن نمی‌باشد، در نتیجه در مرحله بعد، همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعه تکثیر شده، مورد توجه قرار گرفت. در این مرحله همسانه سازی و استخراج پلاسمید نو-ترکیب با موفقیت انجام شد و نهایتاً توالی قطعه کلون شده به-دست آمد. مقایسه توالی‌های آمینواسیدی این ژن در کاسنی با دیگر گونه‌های گیاهی در پایگاه NCBI، نشان داد که کاسنی بیش-ترین شباهت را با دو گونه گل‌مینا و خاراگوش چینی از خانواده گل ستاره‌ای‌ها به‌ترتیب با ۹۰ و ۸۷ درصد درجه یکسانی (جدول ۲) دارد که جایگاه این گونه‌ها در دندروگرام رسم شده نیز این نتایج را تایید می‌کند. لازم به ذکر است که این گونه‌ها دارای مقادیر قابل توجهی از ساپونین‌ها می‌باشند (Irmler et al. 2000). هم‌چنین کمترین درجه یکسانی مربوط به گونه آرابیدوپسیس از خانواده Brassicacea با ۷۶ درصد یکسانی بود، که خود این مقدار نیز قابل توجه است و می‌تواند تاییدی بر صحت توالی مرتبط با β-آمیرین سنتاز باشد. به‌طورکلی از این نتایج می‌توان استنباط کرد که توالی حاصله از کاسنی می‌تواند مربوط به ژن کد کننده β-آمیرین سنتاز باشد. در مطالعات تعیین توالی و شناسایی ژن β-آمیرین سنتاز در شیرین بیان نیز مشخص شد که نواحی حفظ شده زیادی بین شیرین‌بیان و دیگر گونه‌های متعلق به تیره باقلائیان (Fabaceae) وجود دارد (Chen et al. 2013)، هم‌چنین نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیکی گونه‌های متعلق به تیره باقلائیان برای ژن β-آمیرین سنتاز نشان داد که گونه‌های مربوط به یک خانواده در یک شاخه قرار داشتند. نتایج مشابهی برای همین ژن در گیاه دارویی *Gentiana straminea* از تیره جنطیانیه (Gentianaceae) و گونه *Aralia elata* از تیره عشَقه‌ایان یا آرالیا (Araliaceae) به‌دست آمده است (Liu et al. 2009; Wu et al. 2012). به‌طورکلی نتایج حاصل از هم ردیفی اسیدآمینه‌ای ژن β-آمیرین سنتاز در مطالعات مختلف نشان می‌دهد که نواحی حفظ شده بسیار زیادی در بین گونه‌ها وجود دارد، هم‌چنین در بین خانواده‌ها این ژن می‌تواند مشابه و دارای نواحی حفظ شده زیادی باشد.

نتایج مربوط به RT-PCR نیمه کمی جهت بررسی بیان ژن β-آمیرین سنتاز در سطح رونوشت نشان داد که این ژن در رقم زراعی هیرا و ژنوتیپ بومی کردستان در بافت‌های ریشه و برگ، به میزان‌های متفاوتی بیان می‌شود. تجزیه داده‌های RT-PCR نیمه کمی نشان داد که میزان بیان ژن β-آمیرین در ریشه رقم زراعی بیش‌تر از ریشه ژنوتیپ بومی است و در هر دو ژنوتیپ میزان بیان در بافت برگ نسبت به ریشه بسیار کمتر می‌باشد. با توجه به این که ساپونین‌ها بیش‌تر در ریشه‌ها تجمع می‌یابند و هیرا یک رقم اصلاح شده ریشه‌ای است، بنابراین می‌تواند نسبت به یک ژنوتیپ بومی دارای مقادیر بیش‌تری ساپونین باشد، در نتیجه میزان بالای بیان ژن در ریشه رقم هیرا این امر را تایید می‌کند. هم‌چنین میزان بیان کمتر β-آمیرین در برگ نسبت به ریشه در هر دو ژنوتیپ نیز ممکن است دلیلی بر بیوسنتز بیش‌تر ترکیبات ساپونینی در ریشه‌ها باشد. این نتیجه‌گیری از طریق آنالیزهای بیوشیمیایی به‌طور مستقیم در کاسنی تایید شده‌است، به‌طوری‌که Shad و همکاران نشان دادند محتوای کل ساپونین‌ها در ۱۰۰ گرم وزن خشک ریشه برابر ۵۹۰ میلی‌گرم بود در حالی‌که در بافت برگ به میزان ۱۶۰ میلی‌گرم مشاهده شد، که نشان می‌دهد میزان ترکیبات ساپونینی در بافت ریشه حدود سه برابر بیش‌تر از بافت برگ می‌باشد (Shad et al. 2013). میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز و اندازه‌گیری مقدار ساپونین‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی دیگر نیز بررسی شده‌است. به‌عنوان مثال در جودوسر، بیش‌ترین میزان بیان β-

آمیرین در سلول‌های اپیدرمی ریشه گزارش شده‌است (Mylona et al. 2008). در گیاه *Ilex asprella* از تیره خاسیان (Aquifoliaceae) میزان بیان نسبی ژن β-آمیرین سنتاز توسط روش اندازه‌گیری کمی بیان ژن (Quantitative Real Time PCR) نشان داد که سطح بالایی از بیان در بافت ریشه نسبت به بافت‌های ساقه و برگ دیده می‌شود، این نتایج دلالت بر این دارد که محل اولیه و اصلی بیوسنتز تری‌ترپنوئیدها به احتمال زیاد ریشه می‌باشد (Zheng et al. 2015). در گیاه شیرین بیان میزان بالایی از بیان ژن β-آمیرین سنتاز در ریشه گزارش شده‌است (Seki et al. 2008). هم‌چنین در یونجه، ژن β-آمیرین سنتاز در بذرها در مرحله نمو و در ریشه‌ها بیان بیش‌تری نشان داده‌است (Naoumkina et al. 2010). میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز و تجمع ساپونین تری‌ترپنوییدهایی مانند گلیسریزین (در گیاه شیرین بیان) و جینسنوئیدها (در گیاه جینسینگ) به‌ترتیب در بافت ریشه‌های ضخیم و ریشه‌های نابجا بیش‌تر می‌باشد (Hayashi et al. 2004; Cao et al. 2015). در واقع داده‌های متابولیکی و رونویسی در گیاهان مختلف که دارای ترکیبات ساپونینی می‌باشند، ارتباط خوبی بین بیان ژن β-آمیرین سنتاز و تجمع ساپونین‌ها را در ریشه‌ها نشان داده‌اند، که این می‌تواند به حضوری از نسخه‌های رونویسی از ژن β-آمیرین سنتاز در ریشه‌ها در بیوسنتز ساپونین‌ها اشاره داشته باشد (Matsuda et al. 2010; Zheng et al. 2015). هر چند در گونه گل مینا از خانواده گل ستاره‌ای‌ها میزان بیان ژن β-آمیرین سنتاز در مرحله زایشی، در برگ‌ها بیش‌تر از ریشه‌ها گزارش شده‌است، در حالی‌که نتایج تجزیه‌های بیوشیمیایی محتوای بیش‌تری از ساپونین تری‌ترپنوییدها را در ریشه نسبت به قسمت‌های هوایی نشان دادند به طوری‌که محتوای کل ترکیبات ساپونینی از ریشه خشک شده ۱۳۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود ولی در قسمت‌های هوایی خشک شده ۱۳/۸ میلی‌گرم بر گرم مشاهده شد (Corea et al. 2004). چنین نتایجی می‌تواند به روش‌های مختلفی تفسیر شود که محتمل‌ترین آن می‌تواند ناشی از جریان جابجایی ساپونین‌های سنتز شده در قسمت‌های هوایی به طرف ریشه باشد. ممکن است ژن‌های دیگری در بیوسنتز ساپونین تری‌ترپنوییدها در ریشه این گیاهان نقش داشته باشند (Cammareri et al. 2008; Wu et al. 2012). در خاتمه با توجه به نقش β-آمیرین سنتاز و جایگاه آن در مسیر بیوسنتز ساپونین‌های با ارزش، اطلاعات بدست آمده در ارتباط با این ژن می‌تواند در راستای افزایش تولید ساپونین‌ها از طریق بیوتکنولوژی مفید واقع شود. به‌عنوان مثال با افزایش بیان ژن β-آمیرین سنتاز توسط محرک‌های زیستی و غیر زیستی و یا با دست‌ورزی این ژن می‌توان مقدار ساپونین در گیاه کاسنی را افزایش داد.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از بودجه پژوهشی دانشگاه کردستان اجرا شده‌است.

منابع

Barry (1998) The feeding value of chicory (*Cichorium intybus*) for ruminant livestock. Journal of Agricultural Science 131:251-257.

Cammareri M, Consiglio MF, Pecchia P, Corea G, Lanzotti VC, Ibeas JI, Tava A, Conicella C (2008) Molecular characterization of b-amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis. Plant Science 175:255-261.

Cao, H, Nuruzzaman M, Xiu H, Huang J, Wu K, Chen X, Li J, Wang L, Jeong JH, Park SJ, Yang F, Luo J, Luo Z (2015). Transcriptome Analysis of Methyl Jasmonate-Elicited *Panax ginseng* Adventitious Roots to Discover Putative Ginsenoside Biosynthesis and Transport Genes. International Journal of Molecular Sciences, 16: 3035-3057.

Chen H, Liu Y, Zhang X, Zhan X, Liu C (2013) Cloning and characterization of the gene encoding β-amyrin synthase in the glycyrrhizic acid biosynthetic pathway in *Glycyrrhiza uralensis*. Acta Pharmaceutica Sinica. 3:416-424.

Crozier, Alan, Ashihara H (2006) Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Ames, IA: Blackwell Publishing Professional.

Corea G, Iorizzi M, Lanzotti V, Cammareri M, Conicella C, Laezza C, Bifulco M (2004) Astersedifolioside A-C. three new oleane-type saponins with antiproliferative activity, Bioorg. Medicinal of Chemistry 12:4909-4915.

De Bruyn A, Alvarez AP, Sandra P, De Leenheer L (1992) Isolation and identification of ß-D-fructofuranosyl-(2,1)-D-fructose, a product of enzymatic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. Carbohydrate Research 235:303-308.

Ghannadi AR, Minaiyan M, Abed AR (2011) Kasni (*Cichorium intybus* L.). Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine 1:365-372.

Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE (2002) Advances in biochemical engineering. Biotechnology 75:31-49.

Hayashi H, Huang P, Takada S, Obinata M, Inoue K, Shibuya M, Ebizuka Y (2004) Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 27:1086-1092.

Hu L, Xu J (2009) Drug discovery based on classic natural products. Acta Pharmaceutica Sinica 44:11-18.

Hill (1987) Witloof chicory (Belgian endive) trials. Bulletin-Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven 843.

Irmler S, Schroder G, St-Pierre B, Crouch NP, Hotze M, Schmidt J, Strack D, Matern U, Schroder J (2000) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P-450 CYP72A1 as secologanin synthase. Plant Journal 24:797-804.

Li JWH, Vederas JC (2009) Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier. Science 325:161-165.

Liu YL, Cai YF, Zhao ZJ, Wang JF, Li J, Xin W, Xia GM, Xiang FN (2009) Cloning and functional analysis of a β-amyrin synthase gene associated with oleanolic acid biosynthesis in *Gentiana straminea*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 32:818-824.

Matsuda F, Hirai MY, Sasaki E, Akiyama K, Yonekura-Sakakibara K, Provart NJ, Sakurai T, Shimada Y, Saito K (2010) AtMetExpress development: a phytochemical atlas of *Arabidopsis thaliana* development. Plant Physiology 152:566-578.

Martin S, Marta L, Dirk P, Kai JM (2009) Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa*. Phytochemistry 70:517-522.

Munoz CLM (2004) Spanish medicinal Plants: *Cichorium intybus* L. Boletin de la Real Sociedad Espanola de Historia Natural 99:41-47.

Mylona P, Owatworakit A, Papadopoulou K, Jenner H, Qin B, Findlay K, Hill L, Qi X, Bakht S, Melton R, Osbourn A (2008) Sad3 and Sad4 are required for saponin biosynthesis and root development in oat. Plant Cell 20:201-212.

Naoumkina MA, Modolo LV, Huhman DV, Urbanczyk Wochniak E, Tang Y, Sumner LW, Dixon RA (2010) Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. Plant Cell 22:850-866.

Piotr C, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nature protocols 1:581-585.

Qi X, Bakht S, Qin B, Leggett M, Hemmings A, Mellon F, Eagles J, Werck-Reichhart D, Schaller H, Lesot A, Melton R, Osbourn A (2006) A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: from essential sterols to plant defense. Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103:18848-18853.

Sambrook J, Russell D W (2001) Molecular cloning: a laboratory manual 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Muranaka T (2008) Licorice β-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 105:14204-14209.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular Systems Biology 11:7-539.

Shibuya M, Katsube Y, Otsuka M, Zhang H, Tansakul P, Xiang T, Ebizuka Y (2009) Identification of a product specific b-amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry 47:26-30.

Shad MA, Nawaz H, Rehman T, Ikram I (2013) Determination of some biochemicals, phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Cichorium intybus* L.: A comparative study. Journal of Animal and Plant Sciences 23:1060-1066.

Sudhir K, Masatoshi N, Joel D, Tamura K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in bioinformatics 9:299-306.

Van Cutsem P, Jardin P, Beauwens T, Jacqmin C, Vekemans X (2003) Distinction between cultivated and wild chicory gene pools using AFLP markers. Phytochemistry 68:275-297.

Wang Q, Cui J (2009). A review on pharmic effect of chicory (*Cichorium intybus* L) research and development. China Journal of Chinese Materia Medica 34:50-53.

Wink M (2010) Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. second edition. second edition. Inc. New Delhi, India 20-30.

Wu, Y, Zou HD, Cheng H, Zhao CY, Sun LF, Su SZ, Li SP, Yuan YP (2012) Cloning and characterization of a β-amyrin synthase gene from the medicinal tree *Aralia elata* (Araliaceae). Genetics and Molecular Research 11:2301-2314.

Zheng X, Luo X, Ye G, Chen Y, Ji X, Wen L, Xu Y, Xu H, Zhan R, Chen W (2015) Characterisation of two oxidosqualene cyclases responsible for triterpenoid biosynthesis in *Ilex asprella*. International Journal of Molecular Sciences 16: 3564-3578.

Modern Genetics Journal
Vol 11, Number 3, Autumn 2016, Quaternary

Isolation and Expression Pattern of β-amyrin Synthase in Chicory (*Cichorium intybus* L.)

Hossein Panahi Zh[1], Maroufi A[*1], Bahramnejad B[1]

1. Former MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, University of Kurdistan
* Corresponding Author, Email: a.maroufi@uok.ac.ir

A B S T R A C T

Medicinal plants have a range of significant impacts on human health due to their valuable bioactive compounds with medicinal properties. Chicory (*Cichorium intybus* L.) belongs to the family of Astracease, is one of the important medicinal plants which produces several types of secondary metabolites such as triterpenoid saponins. Triterpenoid saponins are the most important terpene compounds, which are often in glycosylated form as valuable substances have many applications in industry and medicine. β-amyrin synthase, an important member of the oxidosqualene cyclases family of enzymes in plants, play a crucial role in triterpene saponin biosynthesis. Because of the importance of saponins in chicory plants, partial isolation and expression of the encoding gene of β-amyrin synthase was aimed. RNA isolation, cDNA synthesis, partial cloning and nucleotide sequencing were successfully performed. Sequencing and bioinformatic analysis of the partial coding regions revealed that the partial isolated β-amyrin synthase gene in chicory is very similar to the β-amyrin synthase in other plant species, particularly Aster and Artemisia. Additionally, transcript gene expression analysis with semi-quantitative RT-PCR method and using GAPDH as reference gene was performed in leaf and root tissues of two different chicory genotypes. Results illustrated that expression levels of β-amyrin in root tissues was significantly higher than those in leaf tissues. Moreover, the transcript level of β-amyrin was considerably different between the two genotypes. The results of this study can be used in a complementary basic research in chicory and also to increase saponins through metabolic engineering.

Key Words

β-amyrin synthase, chicory, saponin, gene expression