



"Bioinformatics study of selected genes involved in the biosynthesis of flavonoids in cumin"

Fereshte Lotfi¹, Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian², Ali Izadi Darbandi², Hossein Ramshini²

1. Former student of agricultural biotechnology

2. Associate Professor, Department of Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburihan College, University of Tehran, Pakdasht

ARTICLE INFO

Article history

Submitted: 2021-07-23

Revised: 2021-08-21

Accepted: 2021-10-11

KEYWORDS

Antibacterial activity;
Antibiotic resistance;
bioformulation; *Klebsiella pneumonia*

ABSTRACT

The formulation of nanoparticles mediated medicinal plant extract is cost-effective, eco-friendly, stable and quicker than conventional methods. These nanoparticles particularly bioformulated silver nanoparticles (AgNPs) using plant extracts are the most effective against bacteria. Therefore, in the present study, we determined the antibacterial activity of *Nigella arvensis*-derived AgNPs (Na-AgNPs) against an antibiotic resistance *Klebsiella pneumonia* using agar well diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC). According to results, the bioformulated Na-AgNPs showed a maximum inhibition zone of 14 mm and MIC value of 15.62 µg/mL against *K. pneumonia*. Therefore, bioformulated Na-AgNPs as an alternative to chemical antibacterial agents can be used to manage of infections in medicine and other industries.

* Corresponding author: *Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian*

✉ E-mail: mortazavian@ut.ac.ir

Journal homepage:





مطالعه بیوانفورماتیکی ژن های منتخب دخیل در مسیر بیوستز فلاونوئیدها در زیره سبز

فرشته لطفی^۱، سید محمد مهدی مرتضویان^۲، علی ایزدی دربندی^۲، حسین رامشینی^۲

۱. دانشجوی سابق بیوتکنولوژی کشاورزی

۲. دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات دانشکدگان ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت

اطلاعات مقاله

تاریخ

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

بازنگری: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۵

کلید واژه

بیوانفورماتیک، پیش بینی، زیره سبز، ساختار ثانویه، فلاونوئیدها.

چکیده

زیره سبز گیاهی یکساله و علفی و متعلق به خانواده جعفری یا چتریان است. در تحقیق حاضر پنج ژن منتخب موثر در مسیر بیوستز فلاونوئیدها که با روش NGS در زیره سبز شناسایی شده و بیشترین تغییر بیانی را داشتند مورد مطالعه بیوانفورماتیکی قرار گرفت از این میان، دو قطعه ژنی DN32640 و DN1196 که دارای بیشترین فاصله تکاملی و از دو خانواده مختلف بودند، جهت شناسایی بیشتر، مورد بررسی قرار گرفتند. توالی DN1196 از خانواده GT6، یک گلیکوزیل ترانسفراز، در مسیر بیوستز ترکیبات فنی، و توالی DN32640 از خانواده BHLH، یک فاکتور رونویسی در مسیر بیوستز آنتوسیانین می باشد پروتئین کد شده توالی DN1196، با شباهت بیش از ۸۵ درصدی با پروتئینی از گیاه هویج، در مرحله پایانی سنتز فلاونول، با انتقال یک مولکول گلوکز، آن را گلیکوزیله می کند در این فرایند دو پروتئین فاکتور رونویسی با این پروتئین در تعامل می باشند ساختار ثانویه پیش بینی شده محصول این ژن، منطبق با توالی پروتئینی هویج مشخص شد پروتئین کد شده توالی DN32640، با شباهت بیش از ۹۰ درصدی با پروتئین هویج، یک فاکتور رونویسی از خانواده BHLH و جزئی از کمپلکس MBW است این فاکتور رونویسی در تنظیم مراحل پایانی مسیر منتهی به بیوستز آنتوسیانین ها و تانن ها دخالت دارد ساختار ثانویه محصول این ژن نیز بر اساس توالی پروتئینی شناسایی شده هویج مشخص شد با توجه به اهمیت این دو ژن و برهمکنش محصول آن ها با سایر پروتئین ها می توان از آن دو در دستورزی های ژنتیکی جهت تولید بیشتر ترکیبات فنی خصوصاً آنتوسیانین در زیره سبز استفاده نمود

* نویسنده مسئول: سید محمد مهدی مرتضویان

✉ ایمیل: mortazavian@ut.ac.ir

آدرس اینترنتی: mpb.znu.ac.ir



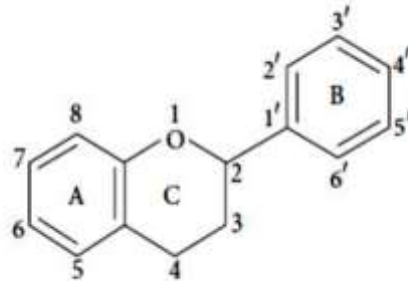


مقدمه

گیاهان دارویی، دسته‌ای از گیاهان هستند که به علت داشتن خواص دارویی از زمان‌های قدیم مورد استفاده انسان بوده و تعدادی از آن‌ها به دلیل داشتن طعم مطبوع به عنوان ادویه در غذا بکار می‌رفته‌اند. این خواص دارویی و ادویه‌ای به دلیل وجود ترکیبات مختلفی است که در طول واکنش‌های متابولیکی، در آن‌ها انباشته می‌شود (Ghasemi et al., 2019). متابولیت‌های ثانویه ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که از متابولیت‌های اولیه مشتق می‌شوند و نقشی در متابولیسم‌های اولیه فتوسنتزی و تنفسی نداشته و بیشتر خاصیت دارویی دارند (Alqethami and Aldhebani, 2021). طیف وسیعی از تنش‌های محیطی زیستی و غیرزیستی مانند: دما، خشکی، شوری، قلیایی بودن، اشعه ماوراءبنفش، عوامل بیماری‌زای گیاهی مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها و نیز گیاه‌خواران، می‌توانند آسیب جدی به گیاهان وارد کنند (Jan et al., 2021). متابولیت‌های ثانویه مجموعه‌ای از واکنش‌های دفاعی مستقیم و

غیرمستقیم فیزیکی و شیمیایی را در گیاهان ایجاد کرده و این دفاع را تسهیل می‌کنند. گروه اصلی متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها هستند (Singh et al., 2021). فلاونوئیدها علاوه بر گیاهان تولید کننده این ترکیبات، برای حیواناتی که از این ترکیبات تغذیه می‌کنند نیز دارای فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی هستند (Saito et al., 2013). تحقیقات نشان می‌دهد، مسیر اصلی بیوسنتز فلاونوئیدها در گیاهان مشترک و کاملاً حفظ شده است (Casati, 2012). فلاونوئیدها دسته‌ای از رنگیزه‌های گیاهی می‌باشند که محل تجمع آن‌ها در واکوئل سلول است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی، مهمترین اثر فلاونوئیدها، در رابطه با بیماری‌هایی مانند پیری و سرطان است که در اثر تنش اکسیداتیو ایجاد می‌شوند (درافشان و همکاران، ۱۳۹۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها وابسته به ساختار آن‌هاست. هرگونه تغییر در ساختار آن‌ها از قبیل آلکیلاسیون، گلیکوزیلاسیون، محیط فیزیکی و شیمیایی ذخیره سازی آن‌ها، مانند نور، اکسیژن، pH، دما و تاریکی باعث ایجاد

تغییرات قابل توجهی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌شود (Casati, 2012) (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار اصلی فلاونوئید (Amer, 2018)

خاصیت آنتی‌اکسیدانی این مولکول‌ها به علت کمبود الکترون در ساختار مولکولی آن‌ها و استعداد واکنش با رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوده و در خنثی نمودن تنش‌های اکسیداتیو نقش حفاظتی را در بدن ایفا می‌کنند (کاظم زاده بنه و همکاران، ۱۳۹۳). فلاونوئیدها می‌توانند آزاد (آگلیکون) و یا مرتبط با قند باشند. مولکول آنتوسیانیدین پس از گلیکوزیله شدن به مولکول آنتوسیانین تبدیل می‌شود که این امر موجب تغییر در رنگ، جذب جانوران و به دنبال آن افزایش گرده افشانی می‌گردد. همچنین گلیکوزیلاسیون موجب افزایش حلالیت، توزیع و متابولیسم از طریق تسهیل انتقال از غشاء می‌شود (Silva, 2021). (Kaur et al., 2021)

glycosyltransferase) آنزیمی است که مولکول‌های قند را به گروه-C3 OH آنتوسیانیدین متصل کرده و آنتوسیانین‌های مسئول رنگ‌های مختلف تولید می‌کند. مولکول‌های آنتوسیانین به دلیل الگوهای مختلف گلیکوزیلاسیون از رنگ زرد تا بنفش را ایجاد می‌کنند. ژن تنظیم کننده MYB با اتصال به پروموتور ژن UFGT فعالیت آن را تنظیم می‌کند

ترکیب خاصی از عوامل رونویسی با تنظیم دقیق مکانی و زمانی مسیر بیوسنتزی، تولید و توزیع فلاونوئیدها را بر عهده دارند (Bogs et al., 2011) و با اتصال به نواحی پروموتور ژن‌های هدف سرعت رونویسی را از طریق RNA پلی‌مراز تغییر می‌دهند

flavonoid3-O-



از ادویه‌جات مورد استفاده در طب هندی، مانند زیره، زنجبیل و میخک به علت وجود مواد پلی‌فنل مانند فلاونوئیدها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و جهش‌زایی و سرطان‌می‌باشند (Das and Savage, 2012). در تحقیقی روی زیرهٔ سبز و چند گیاه دارویی دیگر، با توجه به طیف وسیع متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول‌ها و فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدهای آن‌ها، زیرهٔ سبز بالاترین پتانسیل مهار بیماری‌های باکتریایی (۹۰٪) را از خود نشان داد (Vasantha and Sybiya Packiavathy et al., 2012). بنابراین شناسایی ژن‌های کلیدی و موثر در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات دارویی چند وجهی، در گیاه زیرهٔ سبز ضروری به نظر می‌رسد. در تحقیقی که در دانشکده‌گان ابوریحان انجام شده است، نخستین پروفایل توالی رونوشت در گیاه زیرهٔ سبز به روش NGS گزارش شده است که بر اساس آن می‌توان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه را شناسایی کرده و در تحقیقات بعدی

(Jan et al., 2021). تنظیم ژن‌های رمزگذار آنزیم‌هایی که به طور خاص در مراحل پایانی مسیر منتهی به بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و تانن‌های متراکم هستند، بر عهده کمپلکس MBW است (Bogs et al., 2011). کمپلکس MBW نیز مانند مسیر فلاونوئید در تمام گیاهان به شدت حفظ شده است (Kaur et al., 2021). پروتئین‌های MYC یا BHLH ها که به ۱۲ خانواده تقسیم می‌شوند؛ همگی در دامین حفظ شده و مناطق خاص خارج از دامین مشترک می‌باشند. این دامنه با نزدیک به ۶۰ اسید آمینه دارای ۱۹ اسید آمینه حفظ شده است که ۵ اسید آمینه در ناحیه پایه، ۵ اسید آمینه در مارپیچ اول، یک اسید آمینه در حلقه و ۸ اسید آمینه آن در مارپیچ دوم قرار دارد (Bogs et al., 2011).

گیاه دارویی زیرهٔ سبز^{۱۳} متعلق به خانواده جعفری یا چتریان^{۱۴} گیاهی یکساله و علفی است که در حالت دیپلوئید دارای فرمول $2n = 2x = 14$ و از قدیمی‌ترین و اقتصادی‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد (سورنی و همکاران، ۱۳۹۱). مطالعات نشان می‌دهد بسیاری

¹⁴ Apiaceae

¹³ با نام علمی *Cuminum Cyminum L*

MEGALIGN) پس از هم ردیفی توالی‌های منتخب، به روش CLUSTALW، درخت فیلوژنتیکی رسم شد. پس از هم‌ترازی ژن‌های هویج با ژن‌های زیره و رسم درخت فیلوژنتیکی بین آن‌ها، دو توالی که دورترین فاصله را در این دو درخت داشتند (توالی DN32640 و DN1196) جهت انجام مطالعات بیوانفورماتیکی انتخاب شدند. جهت اطمینان از کد کنندگی پروتئین این دو توالی از نرم‌افزار ORFfinder در سایت NCBI استفاده شد. پس از هم ردیفی با توالی هویج به عنوان نزدیک‌ترین توالی در یونی پرات، ساختار ثانویه این دو توالی در سایت swissmodel و تعاملات پروتئینی آن‌ها در پایگاه داده STRING بر اساس توالی هویج بدست آمد.

نتایج و بحث

از آنجایی که در تحقیق انجام شده در زیره سبزه روش NGS، یکی از مسیرها با بیشترین تغییر بیان در تنش خشکی مربوط به ژن‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها بود، بررسی ژن‌های منتخب در مسیر متابولیسم ترکیبات فنلی به خصوص فلاونوئیدها، دنبال شد. با استفاده از نرم افزار رویگو از

جهت اصلاح این گیاه ارزشمند مورد استفاده قرار داد. هدف از این تحقیق مطالعه بیوانفورماتیک ژن‌های منتخب در مسیر بیوسنتز ژن‌های فلاونوئیدی است که براساس مطالعات گذشته (صادقی و همکاران، ۱۳۹۶) بیان متفاوتی در شرایط تنش خشکی و طبیعی در زیره سبز نشان داده‌اند.

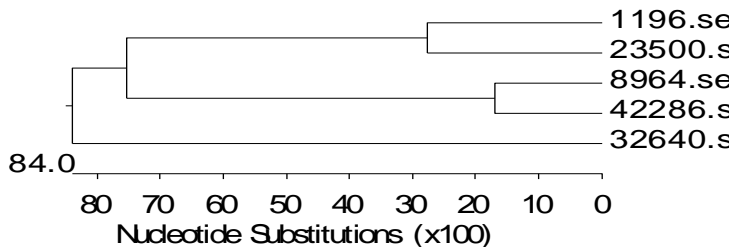
مواد و روش‌ها

جهت بررسی فلاونوئیدها در خانواده چتریان از بخش ژن سایت NCBI، ۹ ژن، مربوط به هویج با نام علمی *Daucus carota subsp sativus*، به دست آمد. با استفاده از نرم‌افزار Megalign 5.00، هم ردیفی توالی FASTA هر یک از این ژن‌ها به روش CLUSTALW انجام و درخت فیلوژنتیکی رسم شد. پنج ژن در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در زیره سبز از میان ژن‌های شناسایی شده در تحقیق گذشته با روش NGS که بیشترین تفاوت بیان را در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط آبیاری طبیعی داشتند، با استفاده از نرم‌افزار REVIGO جدا شدند. با استفاده از نرم افزار (DNASTAR 5.00)



بیان انتخاب شدند. فاصله ژنتیکی این ۵ توالی با نرم افزار مگالاین به روش ClustalW به دست آمد (شکل ۲).

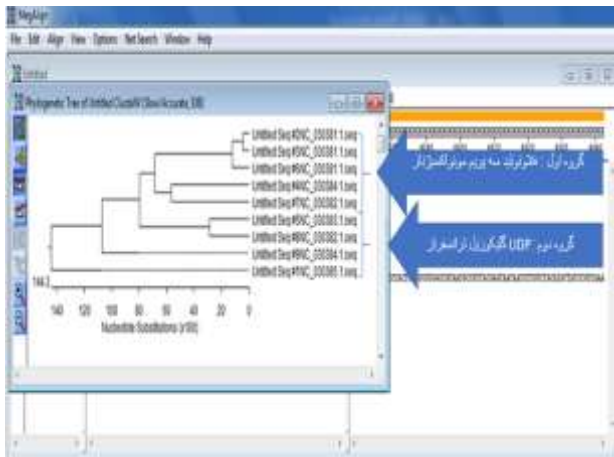
میان ۸۱ ژن با بیشترین تغییر بیان در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در اکوتیپ‌های ۳ (سیوند فارس) و ۱۸ (کوهبان کرمان)، پنج قطعه ژن با بلندترین طول و بالاترین تغییر



شکل ۲- فاصله ژنتیکی پنج ژن شامل بلندترین توالی‌ها در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در زیره سبز

گروه دوم از خانواده UGT بودند. گروه اول به علت تمایز خانوادگی با توالی‌های منتخب زیره حذف شدند و فقط از گروه دوم در بقیه مراحل استفاده شد (شکل ۳).

نتیجه بررسی ژن‌های فلاونوئیدی در سایت NCBI در خانواده چتریان، ۹ ژن از هویج بود که طبق رابطه خانوادگی در دو گروه قرار گرفتند. گروه اول از خانواده فلاونوئید^۳ مونواکسیژناز و

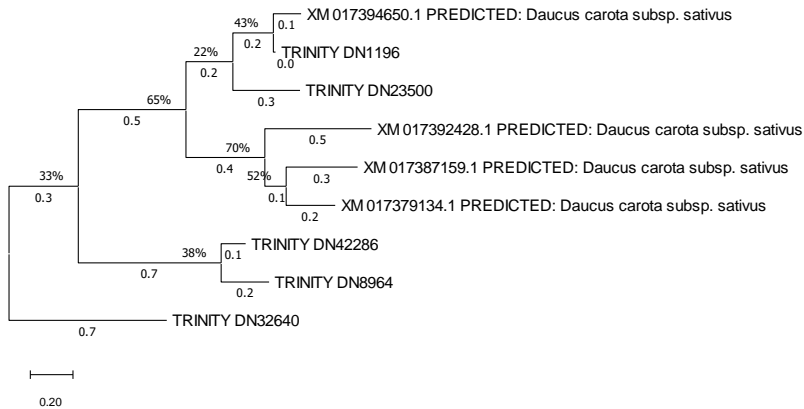


شکل ۳- دسته بندی ژن‌های فلاونوئیدی در خانواده هویج

برای ریشه دار کردن درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل حداکثر درست‌نمایی ترکیبی انجام شد

با نرم افزار Mega X فاصله ژنتیکی ۴ ژن هویج و ۵ ژن زیره سبز به دست آمد. توالی DN32640 بیشترین فاصله را با بقیه توالی‌ها داشت. از این توالی

جدول ۱- تخمین واگرایی تکاملی بین توالی‌ها



	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[50]									
[59]	1.446								
[34]	1.292	0.556							
[28]	1.415	0.873	0.870						
[40]	1.843	2.822	2.077	2.249					
[96]	0.141	1.203	1.098	1.234	1.895				
[86]	1.801	1.852	1.876	2.225	1.965	1.814			
[64]	1.933	2.159	2.011	2.360	1.815	1.871	0.339		
[00]	0.567	1.141	1.261	1.484	2.242	0.573	1.781	1.903	

substitutions per site

شکل ۴- تاریخچه تکاملی ۴ ژن هویج و ۵ ژن زیره سبز در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدی با روش همسایه-پیوستن DN32640 در هردو درخت فیلوژنتیکی توالی‌های DN1196 و با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی دورترین فاصله را دارند. فواصل تکاملی



هترودایمر هستند و در محل G-box به پروموتور ژن‌های هدف متصل می‌شوند. (Zhang et al., 2020). برای اطمینان از داشتن چهارچوب خوانش باز (ORF) جهت کد کردن پروتئین مربوطه این دو توالی، از نرم‌افزار ORFfinder در سایت NCBI استفاده شد (با شرایط: کمترین توالی 70 bp، استاندارد 1، Any sense codon، هر رمزی که اولین اسید آمینه یعنی متیونین (met) را کد می‌کند و Ignore nested ORFs). در توالی DN1196، 10 ORF وجود دارد. بلندترین آن‌ها با 1101 نوکلئوتید، پروتئینی با 366 اسید آمینه را کد می‌کند. در همین صفحه با اتصال به پایگاه یونی پرات، بلاست blastp توالی پروتئین کد شده این توالی، با گیاهان گل‌دار flowering plants (taxid:3398) انجام شد. بلاست با خانواده چتریان نتیجه‌ای نداشت. بالاترین امتیازها از 100 مورد، مربوط به گیاه جینسینگ و توت فرنگی با امتیاز بالای 400 بود. جهت بررسی پروتئین کد شده احتمالی، گیاه

مرکب^{۱۵} محاسبه (جدول ۱) و بر حسب واحد تعداد تعویض‌های باز^{۱۶} در هر جایگاه است. تاریخچه تکاملی با استفاده از روش همسایه-پیوستن^{۱۷} (شکل ۴) استنباط شد. طول شاخه‌ها همان واحدهای فاصله‌های تکاملی است که برای استنتاج درخت فیلوژنتیک استفاده می‌شود. توالی DN32640 بیشترین فاصله را نسبت به بقیه داراست و این به دلیل عملکرد این ژن می‌باشد. با بررسی این ژن در یونی پرات مشخص شد؛ محصول این ژن یک عامل رونویسی است و پروتئینی تولید می‌کند که دارای دامین BHLH بوده و از خانواده BHLH می‌باشد. زانگ در نقش فاکتور رونویسی BHLH SmBHLH92 در تنظیم منفی بیوسنتز اسیدهای فنولیک در مریم‌گلی^{۱۸} معتقد است، تنظیم بیوسنتزی این ترکیبات زیست فعال توسط مجموعه‌ای از فاکتورهای رونویسی (TFs) کنترل می‌شود. این فاکتورهای رونویسی دارای یک ناحیه بازی برای اتصال DNA در انتهای آمین و یک دامنه HLH در انتهای کربوکسیل برای تشکیل همودایمر یا

17 Neighbor-Joining Method
18 Salvia Miltiorrhiza

15 Maximum Composite Likelihood Method
16 Substitutions Per Site

میزان هم‌پوشانی، در بالاترین درجه یعنی قرمز می‌باشد. توالی این پروتئین در گیاه جینسینگ با شماره دسترسی UniProtKB/Swiss-Prot:A0A0K0PVL3.1 UDP-glycosyltransferase ژن 103 بصورت زیر است (شکل ۵): (از شماره ۱۰۷ تا ۴۷۲ از توالی اصلی)

جینسینگ انتخاب شد. پروتئین احتمالی شناخته شده مربوطه، یک UDP-glycosyltransferase 103 با نام مختصر UGTPg103 است. میزان هم‌پوشانی در توالی پروتئینی جینسینگ با ۴۷۲ اسید آمینه، با شباهت ۵۹ درصد و طول پروتئین زیره با ۳۶۹ اسید آمینه، ۹۹ درصد می‌باشد، به طوری که رنگ

```
1  estrivglla dilfdvdfidi adefnvptyv yspagtgflg lafhlqtlnd dkkqdvtefr
61  nsdtellvps fanpvpaefs psiflekdgr hdvllslyrr creakgiivn tfeelepiai
121 nslrmdsmip piypvgpilm lngegqnsde aavilgwldd qppssvflc fgsfgsfpen
181 qvkeiamgle rsghrflwsl rpcisegett lqlkysnlel pagfldrtsc vrkvigwapq
241 mavlaheavg gfvshcgwns vlesvwygmp vatwpmgyeq qlnafemvke lglaveievD
301 yrneynksdf ivkadeietk ikklmmdgkn skirkkvkem keksrvamse ngssytslak
361 lfeeim
```

شکل ۵- توالی، مربوط به UDP-glycosyltransferases. UDPGT با کد A0A0K0PVL3.1 بنابراین می‌توان احتمال داد که توالی DN1196 در زیره سبز یک توالی کد کننده پروتئین با دامین مذکور باشد. توالی DN1196 در یونی پرات با ۵۸/۸ درصد تشابه، در جینسینگ آسیایی یا جینسینگ چینی (*panax ginseng*) یکی از گونه‌های یازده‌گانه سرده جینسینگ، هم وجود دارد. محصول این ژن در جینسینگ-UDP α -D-glucose است. این آنزیم در

این پروتئین در سایت <https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite> دارای ۳۶۶ اسید آمینه و یک دامین از شماره ۲۳۷ تا ۲۸۰ می‌باشد که مربوط به UDPGT، با UDP-glycosyltransferases کد 57PS003 می‌باشد. توالی دامین مورد نظر به صورت زیر می‌باشد:

```
WapQmaVLaveavGfVSHCGwn
SvleSVwygmPVatwPmygEQ
```



یک پروتئین باید از پروتئین‌هایی که ساختار ثانویه آن‌ها مشخص شده و بیشترین تشابه را با توالی پروتئینی ناشناخته دارند استفاده کرد. جهت به دست آوردن ساختار ثانویه توالی پروتئینی احتمالی DN1196، از سایت NCBI استفاده شد. به دلیل تشابه بیش از ۸۰ درصد توالی پروتئینی DN1196 با هویج، از توالی هویج جهت به دست آوردن ساختار ثانویه پروتئین احتمالی زیره سبز استفاده شد. در قسمت BLASTP، در بخش DATA BASE، گزینه pdb انتخاب شد، تا جستجو فقط در میان پروتئین‌های گیاهی که ساختار سه بعدی آن‌ها به دست آمده است انجام شود. پس از BLASTP، چهار گزینه بدست آمد. چهارمین گزینه با ۳۳/۶۱ درصد تشابه و ۹۷٪ همپوشانی به دلیل داشتن یک ساختار انتخاب شد. این پروتئین با ۴۸۹ اسید آمینه متعلق به فیتلاکا دکاندر^{۱۹} با نام سرخاب کولی نام یک گونه از سرده سرخاب کولی از گونه *P. Americana* می‌باشد (شکل ۸).

جینسینگ در واکنشی یک گلوکز به مولکول (20S)-protopanaxatriol اضافه کرده و آن را به (20S)- ginsenoside Rh1 تبدیل می‌کند که یک ترپنوئید و متابولیت ثانویه می‌باشد. توالی DN1196 در یونی پرات با ژن هویج (*Daucus carota* subsp. *sativus*) ۸۵/۸ درصد تشابه دارد و یک UDP-glycosyltransferase است که یک مولکول قند را به یک فلاونول منتقل می‌کند.

WAPQLAVLSHRAVGGFVSHC
GWNSILES VWFGVPMATWPS
YAEQ

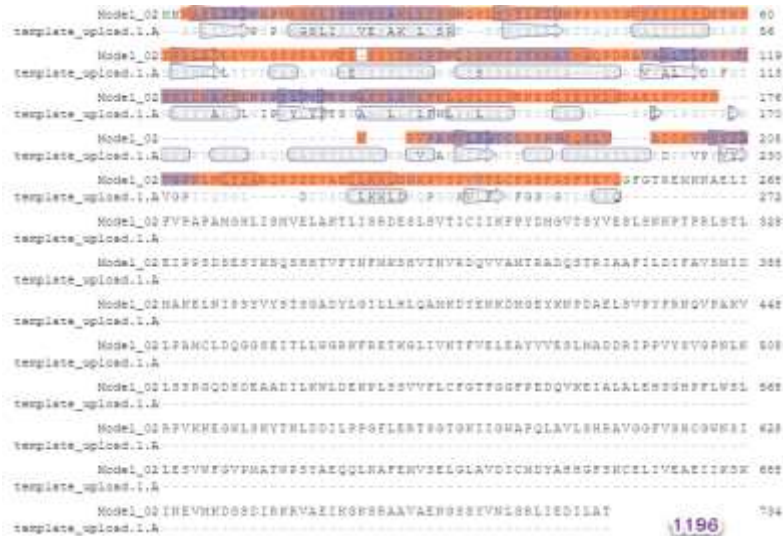
شکل ۶- دامین توالی پروتئینی UDP-glucose
flavonoid 3-O-glycosyltransferase 6
در هویج

توالی دامین در هویج به علت تفاوت سوپرسترا کمی با توالی این دامین در جینسینگ متفاوت است.

WapQmaVLahavgGFVSHCGwnSyl
eSVwygmPyatwPmygEQ
شکل ۷- توالی دامین پروتئین UDP-
glucose flavonoid 3-O-
glucosyltransferase 6 در جینسینگ

برای به دست آوردن ساختار ثانویه

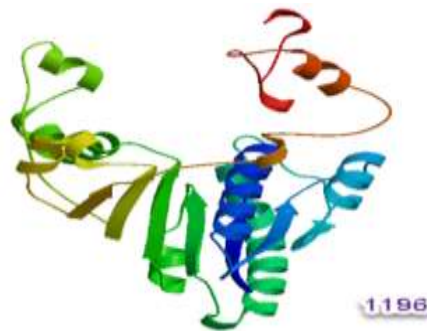
¹⁹ *Phytolacca Decandra*



شکل ۸- هم‌ترازی هویج اهلی با توالی سرخاب کولی در swissmodel.

شده. در سایت swissmodel توالی پروتئینی هویج کپی و ساختار دانلود شده آپلود شد (شکل ۹).

فلش‌ها صفحات بتا و بیضی‌ها مارپیچ آلفا هستند. ساختار پیشنهادی با روش X-ray و با شماره PDB ID: JEN۶ دانلود



شکل ۹- ساختار ثانویه توالی پروتئینی احتمالی DN1196 براساس ساختار هویج تعداد مارپیچ آلفا: ۱۶ زیگزاگ صورتی، تعداد صفحات بتا: ۱۳ فلش سبز



زنجیره منفی و فریم ۳ می‌باشد. شروع از نوکلئوتید ۱۰۶۹ و پایان آن ۳۰۵ است و پروتئینی با ۲۵۴ اسید آمینه را تولید می‌کند. بلاست BLAST توالی پروتئینی مورد نظر با گیاهان خانواده چتریان نتیجه‌ای نداشت ولی با گیاهان گلدار ۸۶ نتیجه داشت. بالاترین امتیاز مربوط به کیوی از خانواده Actinidiaceae، با ۵۵/۱۶٪ تشابه بود. دو توالی اول دارای بیشترین امتیاز هم‌پوشانی بودند که هردو در گیاهان گلدار دولپه‌ای قرار دارند. توالی اول با امتیاز ۲۶۴ و هم‌پوشانی ۹۸ درصدی، پروتئینی در کیوی، دارای دامین BHLH42 بوده و یک عامل رونویسی می‌باشد. توالی دوم با ۲۵۱ امتیاز و هم‌پوشانی ۹۸ درصدی، ژنی در نخود فرنگی، دارای دامین BHLH بوده و طبق گزارش صادقی یک عامل رونویسی است (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶). پروتئین‌های BHLH، دارای دامین BHLH هستند. نقش این پروتئین‌ها در تمام موجودات از مخمر تا انسان، تنظیم رونویسی می‌باشد (سایت NCBI). طول توالی مورد نظر در کیوی ۶۸۹ با شماره دسترسی A0A2R6QE26.1 و در نخود فرنگی

توالی پروتئینی هویج در پایگاه داده STRING و در خانواده چتریان مورد بررسی قرار گرفت. اولین نتیجه به دست آمده در هویج با ۱۰۰ درصد تشابه انتخاب شد تا پروتئین‌های در تعامل با این توالی مشاهده شود. ولی پروتئینی در تعامل با این توالی به دست نیامد. جستجو در گیاهان انجام شد. توالی توت‌فرنگی وحشی نام یک گونه از سرده توت‌فرنگی با نام علمی *Fragaria vesca* با ۵۰٪ درصد تشابه انتخاب شد. در توت فرنگی (*Fragaria vesca*) با شماره دسترسی 918.XP_004303956.1v5 با دو پروتئین فاکتور رونویسی با کد زیر گزارش شده است:

XP_004291469.1Transcription factor HY5-like

XP_004297046.1Transcription factor HY5-like

در گزارش صادقی این توالی از خانواده GT6 در توت فرنگی گزارش شده است. بیان این ژن در تنش خشکی در هر دو ۳ (سیوند فارس) و ۱۸ (کوهبان کرمان) دو برابر حالت معمول بوده است (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶).

توالی DN32640 دارای ۹ ORF است که بلندترین آن‌ها ORF7 بر روی

(BANYULS) و دی هیدروفلاوونول-۴- ردوکتاز (DFR) دارد. توالی مورد نظر در آرآبیدوپسیس به صورت شکل ۱۰ می‌باشد. دامین basic helix-loop-helix (BHLH) از اسید آمینه 161-87 به صورت شکل ۱۱ است. موتیف اتصال به DNA (DNA binding) به صورت شکل ۱۲ است: (96..97,99,104,121...122).
موتیف اتصال به پروتئین‌های همو و هترو دایمر dimer interface [polypeptide binding] به صورت شکل ۱۳ است:
(102..103,106..107,109..110,114,122..123,126..127,130,132..133,136..137)
توالی این پروتئین در کیوی با ۲۷۶ اسید آمینه با نام BHLH42 و شماره 000044807 با زیرهٔ سبز همپوشانی دارد. اسید آمینه ۱۴۰-۷۰ دامین (BHLH) است. موتیف پایه^{۲۵} در بخش ۸۳-۷۰ می‌باشد و اسید آمینه‌های (۱۰۵..۱۰۴، ۸۷، ۸۳..۸۲، ۸۰..۷۹، ۷۶..۷۵) بخش‌های اتصال به DNA^{۲۶} می‌باشند. اسید آمینه‌های

۶۵۲ با شماره دسترسی E3SXU4.1 می‌باشد. جهت بررسی پروتئین کد شده احتمالی، گیاه کیوی انتخاب شد. این پروتئین مربوط به فاکتور رونویسی^{۲۲} BHLH42 به بیان دیگر basic helix-loop-helix protein 42 گیاه کیوی chinensis²³ با نام مختصر AcBHLH42 می‌باشد. طول این پروتئین ۶۸۹ اسید آمینه است که از اسید آمینه ۴۱۴ تا ۶۸۹، با توالی زیرهٔ سبز هم تراز دارد. در این هم تراز ۱۵۵ اسید آمینه (۵۵٪) شباهت وجود دارد. این پروتئین دارای یک دامین basic helix-loop-helix (BHLH) جهت اتصال به DNA بوده و به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می‌کند. این دامنه در پروتئین TT8 در آرآبیدوپسیس تالیانا دیده شده است. خانواده BHLH در آرآبیدوپسیس^{۲۴} شامل چندین فاکتور رونویسی مانند TT8، EGL1 و GL3 است. AtBHLH42 یا EN32 نیز نامیده می‌شود، در کنترل رنگدانه فلاونوئید نقش دارد و نقش کلیدی در تنظیم لکوآنتوسیانیدین ردوکتاز

25 Basic Motif

26 Nucleotide Binding

22 Transcription Factor

23 *Actinidia Chinensis* Var24 *Arabidopsis thaliana*

دایمر است^{۲۷}. (شکل ۱۴)

(85..86,89,92..93,96,105..10
6,109..110,113,116,119..120,12
3,126..127,129..130,133,136..1
37,140)

84..119 بخش HLH motif است

که در این منطقه اسید آمینه‌های زیر
محل تشکیل دایمر و یا رابط

1 61 121 181 241	mevsrfgnak aragarrs afqrwdyarl tkpphtkqgs hqqqmlktsl lsiprlftvr rgidehdeql sgnamesaet adghiqrgdg rhmmaerkr eklndrfvtl rslvpyvskq dkvslldgai dfikdlqrqv eelesrrkis enpskrvei tvennavfe isspwrqdll iailetvgt hmqedvaak vskdtfkatl kakvtssgid ddddedkks ikqiretlls vvnngnsptf eklc شکل ۱۰
1 61 121 181 241	mevsrfgnak aragarrs afqrwdyarl tkpphtkqgs hqqqmlktsl lsiprlftvr rgidehdeql sgnamesaet adghiqrgdg rhmmaerkr eklndrfvtl rslvpyvskq dkvslldgai dfikdlqrqv eelesrrkis enpskrvei tvennavfe isspwrqdll iailetvgt hmqedvaak vskdtfkatl kakvtssgid ddddedkks ikqiretlls vvnngnsptf eklc شکل ۱۱
1 61 121 181 241	mevsrfgnak aragarrs afqrwdyarl tkpphtkqgs hqqqmlktsl lsiprlftvr rgidehdeql sgnamesaet adghiqrgdg rhmmaerkr eklndrfvtl rslvpyvskq dkvslldgai dfikdlqrqv eelesrrkis enpskrvei tvennavfe isspwrqdll iailetvgt hmqedvaak vskdtfkatl kakvtssgid ddddedkks ikqiretlls vvnngnsptf eklc شکل ۱۲
1 61 121 181 241	mevsrfgnak aragarrs afqrwdyarl tkpphtkqgs hqqqmlktsl lsiprlftvr rgidehdeql sgnamesaet adghiqrgdg rhmmaerkr eklndrfvtl rslvpyvskq dkvslldgai dfikdlqrqv eelesrrkis enpskrvei tvennavfe isspwrqdll iailetvgt hmqedvaak vskdtfkatl kakvtssgid ddddedkks ikqiretlls vvnngnsptf eklc شکل ۱۳
1 61 121 181 241	yssqsfskw plrpsdhhhq adatsqcllk yilftvpflh skyrdnnsp ksataadsas rfrkptpqde lsanhvlaer rreklnerf iilrslvpfv tkmdkasilg dtieyvkqlr kniqdleara rqieidqrsr ssgdpqrsga kaatdkrklr iveasggak kavdsavat ppppappqp agvgvqvqs iiesdalvel qcthreglll dvmvvlrdhr vevtavqssl tngvfvaerl akvkenvngk kpsivevkra ihqiip شکل ۱۴

آمده ، بخش زرد دامین مشترک کیوی،
زیره سبز و هویج است.

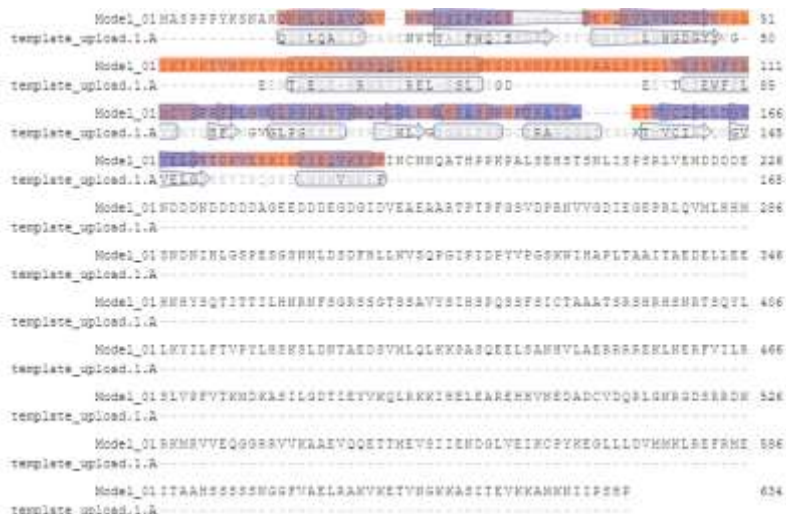
```
e Isanhvlaer rrreklnerf iilrslvpfv  
tkmdkasilg dtieyvkqlr kniqdleara  
rqieidqrsr
```

نقش‌های این ژن در مسیر پیام
رسانی با واسطه اسید جاسمونیک-
تنظیم مثبت فرآیند بیوسنتزی
آنتوسیانین- تنظیم فرآیند بیوسنتزی
ماکرومولکول سلولی- تنظیم فرآیند
بیوسنتزی پروآنتوسیانیدین- توسعه
پوشش بذر و تمایز تریکوم می‌باشد. پس
از بلاست توالی DN32640 در یونی
پرات نزدیک ترین توالی، توالی هویج
اهلی بود. از این توالی پروتئینی جهت
به دست آوردن ساختار ثانویه توالی
DN32640 در سایت NCBI استفاده
شد. با توالی هویج ۵ توالی از
آرابیدوپسیس نتیجه داد. طول تمام این
توالی‌ها زیر ۲۰۰ اسید آمینه بود.
بنابراین فقط بخش کوچکی از توالی
هویج قابل پیش بینی ساختار ثانویه قرار
گرفت (شکل ۱۵).

بنابراین توالی DN32640 یک توالی
کد کننده پروتئین در زیره سبز با دامین
احتمالی زیر می‌باشد.

```
e Isanhvlaer rrreklnerf iilrslvpfv  
tkmdkasilg dtieyvkqlr kniqdleara  
rqieidqrsr
```

در یونی پرات توالی DN32640
با ۲۵۰ توالی دیگر ازدولپه‌ای‌ها ۴۸.۳٪
تا ۹۱.۴٪ یکسانی را نشان داد. تمامی
این موارد پروتئین‌هایی هستند که
دارای دامین BHLH هستند. دو توالی
اول که بیش از ۹۰٪ شباهت را دارا
هستند، از گروه هویج خوراکی و هویج
وحشی می‌باشند که هر دو از خانواده
چتریان هستند. اولین پروتئین، در
هویج خوراکی *Daucus carota*
subsp. sativus (Carrot) با کد
A0A162B508 است که ۹۱.۴٪
یکسانی را نشان می‌دهد. طول این توالی
در هویج ۱۱۶۱ و در زیره ۱۰۷۱
می‌باشد. بخش‌های یکسان از اسید
آمینه ۳۰۸ تا ۶۳۴ می‌باشد که در این
میان ۹۶.۹٪ تشابه کامل وجود دارد.
دامین مشترک زیره سبز و کیوی در زیر



شکل ۱۵- هم‌ترازی هویج اهلی با توالی RQW آرابیدوپسیس در سوئیس مدل.

فلش‌ها صفحات بتا و بیضی‌ها ماریپیج آلفا هستند

در ساختار پیش بینی شده هویج بر اساس توالی ARQW در آرابیدوپسیس (شکل ۱۶).
۶ صفحات و ۷ ماریپیج آلفا وجود دارد



شکل ۱۶- ساختار ثانویه توالی پروتئینی احتمالی DN32640 زیره سبز بر اساس ساختار هویج

۶ بتا شیت و ۷ آلفا هلیکس

جهت شناسایی پروتئین‌هایی که در تعامل با این پروتئین در هویج هستند در سالیته
در میان خانواده چتریان جستجو انجام شد.
STRING توالی پروتئینی هویج وارد شد.

در هویج داشتند، متعلق به دو خانواده متفاوت پروتئینی هستند. در بررسی‌های بیوانفورماتیکی مشخص شد، هردو توالی DN1196 و DN32640 چهارچوب خوانش باز ORF هستند. بلندترین خوانش توالی DN1196 کد کننده پروتئینی با ۳۶۶ اسید آمینه و توالی DN32640 کد کننده پروتئینی با ۳۵۴ اسید آمینه می‌باشد. پروتئین احتمالی توالی DN1196 از خانواده GT6 در هویج با تشابه بیش از ۸۵ درصد، انتقال دهنده یک مولکول گلوکز به یک مولکول فلاونول و گلیکوزیله کننده آن می‌باشد. ساختار ثانویه این پروتئین براساس توالی پروتئینی هویج و ساختار ثانویه مدل گیاه سرخاب کولی دارای ۱۰ صفحه بتا و ۱۶ مارپیچ آلفا می‌باشد. این توالی در زیره سبز با بیش از ۵۰ درصد تشابه با توالی پروتئینی توت فرنگی احتمالاً با دو پروتئین فاکتور رونویسی HY5 در تعامل می‌باشد. بیان این ژن در زیره سبز در تنش خشکی در اکوتیپ‌های ۳ (سیوند فارس) و ۱۸ (کوهبان کرمان) دو برابر حالت معمول بوده است؛ بنابراین می‌تواند در آزمایشات بعدی جهت افزایش تولید گلیکوزیل فلاونول که مهمترین عضو خانواده فلاونوئیدها می‌باشند مورد بررسی قرار گیرد. توالی DN32640 کد کننده پروتئینی احتمالی با

نتیجه تماماً در هویج به دست آمد. اولین گزینه با ۱۰۰ درصد تطابق همان توالی داده شده بود و بقیه زیر ۳۵ درصد تطابق داشتند. گزینه اول انتخاب شد. طبق تحقیق صادقی بیان ژن DN32640 در تنش خشکی در اکوتیپ ۳ (سیوند فارس) نصف و در اکوتیپ ۱۸ (کوهبان کرمان) دو برابر شده است که نشان از اهمیت این ژن در شرایط تنش خشکی در افزایش یا کاهش تولید آنتوسیانین، در بین اکوتیپ‌های مختلف می‌باشد (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶).

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر دو توالی DN1196 و DN32640 از پنج ژن منتخب پیشنهادی در زیره سبز در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی که بیشترین تغییر بیان را در تنش خشکی در تحقیقات قبلی داشتند، مورد بررسی بیوانفورماتیکی قرار گرفت و پس از بررسی هم‌ردیفی هردو توالی با توالی هویج از خانواده چتریان بیش از ۸۵ درصد تشابه نشان دادند. بنابراین از آنجایی که اطلاعات ژنتیکی کمی در باره زیره سبز وجود داشت، جهت شناسایی پروتئین احتمالی این ژن‌ها از توالی هویج استفاده شد. این دو توالی که بیشترین فاصله ژنتیکی را در میان ۵ توالی منتخب زیره سبز و توالی ژن‌های فلاونوئیدی



از آنجایی که این پروتئین یک فاکتور رونویسی می‌باشد و فاکتورهای رونویسی در گروه MBW فعالیت می‌کنند، تعداد بالای پروتئین‌های در تعامل توجیه می‌شود. از این ۱۰ پروتئین، یک فاکتور TT1 از خانواده WD40، یک فاکتور ELF6 از خانواده ADOX1، ۳ فاکتور از خانواده MYB، یک لیگاز VI، یک ARF، یک نوع ویتامین K و یک پروتئین از خانواده HOX از عوامل رونویسی و دخیل در مسیر بیوسنتز متابولیسم‌های ثانویه می‌باشند. کاهش و افزایش بیان این ژن در تنش خشکی در اکوتیپ‌های ۳ و ۱۸، نشان از تاثیر دو برابری این ژن در افزایش و کاهش دو برابری تولید آنتوسیانین در زیره سبز دارد. بنابراین می‌تواند گزینه مناسبی در بررسی‌های آینده در تولید آنتوسیانین در زیره سبز باشد.

دامین بسیار حفظ شده BHLH، دارای یک موتیف بازی جهت اتصال به DNA و یک موتیف HLH جهت تشکیل دایمر پروتئینی متصل شونده به پروموتور DNA هدف به منظور تنظیم رونویسی از ژن هدف در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین می‌باشد. این پروتئین احتمالی از خانواده TFS و یک فاکتور رونویسی است. براساس تشابه بیش از ۹۰ درصدی با پروتئین هویج، این پروتئین یک تنظیم کننده مثبت فرایند بیوسنتز آنتوسیانین و پروآنتوسیانین می‌باشد. با توجه به تشابه بیش از ۹۰ درصدی با توالی هویج و بالاترین تشابه با ساختار ثانویه پروتئین مشابه در آراییدوپسیس، ساختار ثانویه این پروتئین احتمالی در زیره سبز دارای ۶ صفحه بتا و ۷ مارپیچ آلفا خواهد بود. براساس توالی هویج احتمالاً این پروتئین با ۱۰ پروتئین دیگر در تعامل خواهد بود.

ملاحظات اخلاقی:

حامی مالی: این پژوهش هیچ کمک مالی از سازمان های تأمین مالی دریافت نکرده است.

تعارض منافع: طبق اظهار نویسنده، این مقاله تعارض منافع ندارد.

برگرفته از پایان نامه/رساله: این مقاله برگرفته از پایان نامه/رساله نبوده است.

- Journal of Biological Sciences Medicinal plants used in Jeddah , Saudi Arabia : Phytochemical screening. Saudi J. Biol. Sci. 28(1): 805–812. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.013.
- Amer, A. 2018. BIOTECHNOLOGY APPROACHES FOR IN VITRO PRODUCTION OF FLAVONOIDS. : 457–468. doi: 10.15414/jmbfs.2018.7.5.457-468.
 - Bogs, J., C. Kappel, S. Delrot, and V. Lauvergeat. 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. 62(8): 2465–2483. doi: 10.1093/jxb/erq442.
 - Casati, P. 2012. Flavonoids : biosynthesis , biological functions , and biotechnological applications. 3(September): 1–15. doi: 10.3389/fpls.2012.00222.
 - Das, S.G., and G.P. Savage. 2012. Total and Soluble Oxalate Content of Some Indian Spices. Plant Foods Hum. Nutr. 67(2): 186–190. doi: 10.1007/s11130-012-0278-0.
 - Ghasemi, S., H.H. Kumleh, منابع
 - سورنی، ج. رستمی احمدوندی، ح. کهریزی، د. معصومی، م. چقامیرزا، ک. کیانی، س. (۱۳۹۱) بررسی ارتباط نشانگرهای پروتئینی و مورفولوژیکی در توده‌های گیاه داروئی زیرهٔ سبز). *Cuminum cyminum L*. انجمن ژنتیک ایران، دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران.
 - صادقی، د. مرتضویان، م. بختیاری زاده، م. (۱۳۹۶) ارزیابی توالی رونوشت گیاه داروئی زیرهٔ سبز (*Cuminum cyminum L*) با استفاده از- RNA seq. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۹، شماره ۴، ص ۱۱۶–۱۰۱.
 - درافشان، م. سلطانی حویزه، م. شریعتی، و. (۱۳۹۸) شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئید در میوهٔ گیاه داروئی هندوانهٔ ابوجهل (*Citrullus colocynthis (L.) Schrad*). نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۳۵، شماره ۴، ص ۷۰۲–۶۹۱.
 - کاظم زاده بنه، ه. کرامتی، م. مهنا، ن. عابدی، ح. تیزفهم، پ. (۱۳۹۳) ژنتیک و بیوشیمی بیوسنتز آنتوسیانین در گیاهان. اولین کنگرهٔ زیست شناسی و علوم طبیعی ایران، ص ۸–۱.
 - Alqethami, A., and A.Y. Aldhebiani. 2021. Saudi

- Characteristics and Biological Activity. : 1–16.
- Singh, S., I. Kaur, and R. Kariyat. 2021a. The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions.
 - Sybiya Vasantha Packiavathy, I.A., P. Agilandeswari, K.S. Musthafa, S. Karutha Pandian, and A. Veera Ravi. 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Res. Int.* 45(1): 85–92. doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.022.
 - Zhang, J., H. Lv, W. Liu, A. Ji, X. Zhang, et al. 2020. bHLH transcription factor SmbHLH92 negatively regulates biosynthesis of phenolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza*. *Chinese Herb. Med.* 12(3): 237–246. doi: 10.1016/j.chmed.2020.04.001.
 - and M. Kordrostami. 2019. Changes in the expression of some genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. under UV stress. *Protoplasma* 256(1): 279–290. doi: 10.1007/s00709-018-1297-y.
 - Jan, R., S. Asaf, M. Numan, and K. Kim. 2021. Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. : 1–31.
 - Kaur, R., L. Aslam, S. Hussain, N. Kapoor, and R. Mahajan. 2021. Flavonoid Biosynthetic Pathway: Genetics and Biochemistry. 18(June): 271–286.
 - Saito, K., K. Yonekura-sakakibara, R. Nakabayashi, Y. Higashi, M. Yamazaki, et al. 2013. Plant Physiology and Biochemistry The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiol. Biochem.* (February): 1–14. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.001.
 - Silva, A.M.S. 2021. Plant Flavonoids: Chemical