

## شناسایی ژن کلیدی *CPT1* در مسیر بیوسنتزی لاستیک طبیعی در گیاه *Chodrilla juncea* و استخراج لاستیک به روش آنزیمی

بنیامین جلیلی<sup>۱</sup>، اصغر میرزایی اصل<sup>۲\*</sup>، هدایت باقری<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران  
۲. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

### چکیده

لاستیک طبیعی ماده‌ای حیاتی برای صنعت است که به طور معمول از درخت کائوچو (*Hevea brasiliensis*) به دست می‌آید. با توجه این‌که امکان کشت این درخت در بسیاری از مناطق وجود ندارد، یافتن منبع جایگزین برای این ماده با ارزش ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه وجود لاستیک طبیعی در گیاه قندرون با نام علمی *Chondrilla juncea* از لحاظ مولکولی و بیوشیمیایی بررسی شد. نتایج نشان داد با استفاده از روش آنزیمی می‌توان مقدار قابل ملاحظه‌ای لاستیک طبیعی در فصل پاییز از ریشه‌ی این گیاه استخراج نمود. همچنین در مطالعه حاضر ژن کلیدی سیس پرنیل ترانسفراز (CPT) دخیل در بیوسنتز لاستیک طبیعی با استفاده از آغازگرهای مختلف روی DNA ژنومی این گیاه با روش گام‌زنی شناسایی و توالی‌یابی شد. پس از سرهم‌بندی قطعات به دست آمده، توالی کامل این ژن به دست آمد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن شباهت زیادی به ژن CPT در سایر گیاهان این خانواده و حتی درخت کائوچو نشان داد. نتایج این تحقیق اولین گزارش تولید لاستیک طبیعی در گیاه قندرون است. با مطالعات بیشتر در این زمینه و برنامه‌های به‌نژادی شاید بتوان این گیاه را به‌عنوان منبع جدید تجاری برای تولید لاستیک طبیعی معرفی نمود.

**کلمات کلیدی:** توالی‌یابی، درخت کائوچو، سیس پرنیل ترانسفراز، قندرون

## مقدمه

لاستیک طبیعی (*Natural Rubber: NR*) عمدتاً شامل سیس ۴،۱-پلی ایزوپرن و یکی از مهم‌ترین پلیمرهای گیاهی است. این ترکیب در بیش از ۴۰۰۰ محصول مرتبط با حمل و نقل و صنایع دفاعی و بیش از ۴۰۰ وسیله پزشکی کاربرد دارد. لاستیک طبیعی از مونومرهای ایزوپنتیل پیروفسفات ( *Isopentenyl PyroPhosphate: IPP*) و فارنسیل پیروفسفات ( *Farnesyl PyroPhosphate: FPP*) از مسیر بیوشیمیایی مولونات و همچنین غیرمولونات (*Non-Mevalonate*) تشکیل می‌شود.

درخت لاستیک (*Hevea brasiliensis* Mull, Arg) در مناطق استوایی به‌صورت کلونال با پیوند جوانه روی پایه‌های نهال رشد می‌کند و تا به امروز تنها منبع تجاری لاستیک طبیعی است. بیش از ۹۰ درصد لاستیک طبیعی دنیا در کشورهای مالزی، اندونزی و تایلند تولید می‌شود (Cornish, 2017). با این حال بعضی از گیاهان، مقادیر قابل توجهی از لاستیک با وزن مولکولی بالا و از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه تولید می‌کنند که شامل یک درختچه به نام گویول (*Parthenium argentatum*) و قاصدک روسی (*Taraxacum kok-saghyz*) است (Van Beilen & Poirier, 2007).

بیوسنتز لاستیک طبیعی در سطح نوعی اندامک در شیره‌ی سلول‌های تخصصی به نام لاتیسفر در درخت لاستیک یا قاصدک روسی و یا در سلول‌های پارانشیم ساقه‌ی گیاه انجام می‌شود. این اندامک با غشا تک لایه‌ی لیپیدی در اندازه‌های مختلف از ۰/۲ تا ۰/۴ میکرون، بسته به گونه‌ی گیاهی متفاوت است و همچنین سطح آن توسط پروتئین‌های مختلف پوشیده شده است. تعداد، نوع و ترکیب پروتئین‌های سطحی در گونه‌های مختلف بسیار متنوع است. طول‌سازی زنجیره لاستیک توسط پروتئین‌های سطحی انجام می‌شود و پلیمر ساخته‌شده در داخل اندامک تجمع پیدا می‌کند.

مهم‌ترین پروتئین‌های موجود در سطح این اندامک شامل فاکتور طول‌سازی لاستیک ( *Rubber Elongation Factor: REF*)، پروتئین‌های کوچک ذرات لاستیک ( *Small Rubber Particle Protein: SRPP*)، پروتئین‌های سیس پرنیل ترانسفراز ( *Cis-Prenyl Transferase: CPT*) و پروتئین‌های شبیه سیس پرنیل ترانسفراز ( *Cis-Prenyl Transferase Like: CPTL*) است (Brown et al., 2017).

بیوسنتز لاستیک طبیعی توسط CPT در سه مرحله انجام می‌شود، این آنزیم نیازمند کاتیون دو ظرفیتی مثل  $Mg^{2+}$  یا  $Mn^{2+}$  به‌عنوان کوفاکتور برای فعالیت خود است (Costa et al., 2005).

ژن *CPT* جز خانواده بزرگ آنزیمی است که طی تکامل حفظ شده و در بخش مهمی از حیات نقش داشته است (Uthup et al, 2019). سیس پرنیل ترانسفراز (*CPT*) فعالیت افزودن ایزوپنتیل پیروفسفات (*IPP*) را در زنجیره پلی پرنیل (*Polyprenl*) دارد و در واقع جزء اصلی ترانسفراز لاستیک طبیعی و وظیفه پلیمریزه کردن واحدهای ایزوپرن با زنجیره کربنی ۱۰ تا ۱۰۰۰۰ واحد را دارا می‌باشد. موتیف R و G در انتهای کربوکسیل این پروتئین نقش ویژه‌ای در فعالیت پرنیل ترانسفراز دارد (Grabińska et al, 2016). مقایسه ایزوفرماهای ژن *CPT* در گیاهان مختلف و بررسی عملکرد پروتئینی آن می‌تواند نقش این ژن را بهتر نشان دهد. از دیگر ویژگی‌های این ژن عدم وجود اینترون در چارچوب کامل آن است. وجود SNPها در جایگاه‌های خاص باعث تفاوت بیان و در نهایت تفاوت در میزان لاستیک می‌شود (Uthup et al, 2019).

فقدان تنوع زیستی در میان جنگل‌های درخت لاستیک و مخاطرات زیست‌محیطی از جمله بیماری‌ها، عرضه مداوم این محصول را با مشکلاتی روبه‌رو می‌سازد، به همین دلیل یافتن منبع جایگزین برای تولید لاستیک طبیعی منشأ بسیاری از تحقیقات در این زمینه بوده است (Cornish, 2001). به دلیل اقلیم خاص ایران، امکان کاشت و بهره‌برداری از درخت لاستیک فراهم نیست. بسیاری از گیاهان خانواده کاسنی دارای شیرابه‌ی سفیدرنگ حاوی لاستیک طبیعی هستند. یکی از گیاهان این خانواده، گیاه قندرون است که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی لاستیک طبیعی در این گیاه صورت نگرفته است. قندرون با نام علمی *Chondrilla juncea* از تبار *Cichorieae* در سراسر جهان پراکنده است. یک گونه چندساله با برگ‌های طوقه‌ای، ساقه‌ای بی‌برگ و گل‌های زردرنگ است و معمولاً به‌صورت علف هرز در کشتزارها و مناطق بایر می‌رویند (Mozaffarian, 1996). این گیاه از طریق آپومیکسی گامتوفیتی کلونی تشکیل می‌دهد اما گاهی به‌صورت جنسی نیز تکثیر می‌یابد (Chaboudez, 1994). طبق بررسی منابع انجام‌شده این گیاه تنها از جنبه‌های دارویی موردتوجه قرار گرفته است و از لحاظ پتانسیل تولید

گیاه قندرون در فصل پاییز ۱۳۹۹ و بهار سال ۱۴۰۰ از محوطه‌ی دانشگاه بوعلی سینا همدان جمع‌آوری و برای شناسایی جنس و گونه به گروه زیست‌شناسی گیاهی دانشگاه انتقال یافت (شکل ۱). به‌منظور حذف آلودگی سطحی، قندرون ابتدا با آب شهری و سپس با آب مقطر در آزمایشگاه شستشو و روی کاغذ صافی خشک شدند. ساقه‌ها و ریشه‌های گیاه که بافت ترد و نازک داشتند با استفاده از تیغ اسکالپل استریل به قطعات کوچک برش خورده و برای استخراج DNA در یخچال منفی ۲۰ نگهداری شدند.



شکل ۱- جمع‌آوری گیاه قندرون از مزارع دانشگاه بوعلی سینا

فیلتر شد. در این مرحله مواد لیگنوسولولوزی و سایر ترکیبات شامل اینولین از گیاه حذف شد. این مرحله با آب مقطر دو بار دیگر تکرار گردید. در مرحله بعد، مقدار ۱۵ میلی‌لیتر آنزیم سلولاز صنعتی از شرکت زیست‌توده پرور شمال به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۳ روز در دمای ۴۰ درجه انکوبه شد. سپس ذرات لاستیک که روی محلول به‌صورت شناور درآمده بود جمع‌آوری و فیلتر شدند. لاستیک استخراج شده یک روز در آن در دمای ۴۰ درجه قرار گرفت و در نهایت لاستیک خشک با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی وزن شد. استخراج لاستیک با استفاده از روش هیدرولیز آنزیمی از گیاه قندرون در سه تکرار جهت مقایسه مقدار لاستیک در دو فصل پاییز و بهار انجام شد. میزان تولید لاستیک در فصل‌های مختلف توسط نرم‌افزار SAS آنالیز شد.

لاستیک طبیعی و بررسی ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی لاستیک طبیعی بررسی نشده است. در این راستا در پژوهش حاضر گیاه کمتر شناخته‌شده *Chondrila junica* از لحاظ تولید لاستیک طبیعی و بررسی ژن *CPT* مورد مطالعه قرار گرفته است. مقایسه توالی و عملکرد ژن‌های مسیر بیوسنتزی لاستیک طبیعی در گیاهان مختلف می‌تواند در شناخت دقیق‌تر مسیر متابولیکی کمک کند.

### مواد و روش‌ها جمع‌آوری نمونه گیاهی

#### استخراج شیرابه (لاستیک طبیعی)

استخراج لاستیک از گیاه قندرون در محیط طبیعی و کشت درون‌شیشه‌ای انجام شد. مطالعاتی جهت یافتن روش مناسب برای استخراج لاستیک از لحاظ صرفه‌ی اقتصادی و بازدهی بالاتر انجام شد، بنابراین روش استخراج با استفاده از هیدرولیز آنزیمی (Sikandar *et al.*, 2017) انتخاب گردید. ریشه‌های گیاه قندرون با قطر بین ۵ تا ۷ میلی‌متر از مزرعه‌ی دانشگاه بوعلی‌سینا در دو فصل مجزا در آبان ماه سال ۱۳۹۹ و اردیبهشت ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد. ریشه‌ها با آب جاری شستشو داده شدند و به قطعات کوچک‌تر تقسیم و به مدت ۴۸ ساعت در آن در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس مقدار ۱۰ گرم از ریشه خشک‌شده برای مراحل بعدی آزمایش وزن و با آسیاب خرد شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱۰ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۳۵ دقیقه جوشانده و با کاغذ صافی

### استخراج DNA

حدود ۱۰۰ میلی گرم بافت تازه ریشه و ساقه‌ی گیاه، برای استخراج DNA درون هاون چینی استریل که قبلاً توسط ازت مایع سرد شده قرار گرفت. پس از پودر کردن بافت گیاهی درون هاون چینی با استفاده از ازت مایع، بافت پودر شده درون ویال ۲ میلی‌لیتری قرار داده شد. از روش CTAB تغییر یافته جهت استخراج DNA استفاده شد (Aboul-Maaty and Oraby, 2019). در نهایت به رسوب DNA در هر ویال ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا DNA در آب مقطر حل شود و در یخچال منفی ۲۰ برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) نگهداری شد. برای بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده از نانودراپ و بررسی روی ژل آگارز استفاده شد.

### کشت درون شیشه‌ای و بررسی میزان لاستیک

از قطعات ریشه و ساقه به ابعاد ۴ تا ۶ میلی‌متر حاوی

جوانه جانبی برای کشت درون شیشه‌ای استفاده گردید. پس از شستشو و پاک‌سازی اولیه جهت ضد عفونی سطحی از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس هیپوکلرید سدیم ۲ درصد به مدت ۸ دقیقه استفاده شد. در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شستشو انجام و روی کاغذ صافی استریل خشک شد. انتهای قطعات گیاهی که دچار سوختگی و آسیب شده بودن، برش خوردند و با پنس استریل درون محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA قرار گرفت (Martinez *et al*, 2021). نمونه‌های کشت شده در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روشنایی ۱۶ ساعت به مدت دو ماه قرار گرفتند. از ۱۰ گرم کالوس (شکل ۲) خشک شده پس از دو ماه از زمان کشت، استخراج لاستیک به روش آنزیمی (Sikandar *et al*, 2017) انجام شد.



شکل ۲- کالوس زایی گیاه قندرون درون محیط کشت حاوی هورمون NAA و BA

### طراحی آغازگر و PCR

تعیین توالی نواحی داخلی ژن *CPT* بر اساس توالی درخت کائوچو و گیاهان دیگر تولیدکننده‌ی لاستیک طبیعی انجام شد. در مرحله اول برای دستیابی به بخشی از توالی در میانه‌ی ژن، از نواحی حفاظت شده‌ی ژن *CPT1* در گیاهان خانواده Euphorbiaceae و خانواده Asteraceae شامل *Hevea brasiliensis* (Asawa, 2003)، *Euphorbia*

*characias* (Spano *et al*, 2015) و *Taraxacum kok-saghyz* (Schmidt *et al*, 2010) با استفاده از منابع انتشار یافته آغازگر تهیه گردید (جفت آغازگرهای ۱ تا ۵). آغازگرهایی بعدی (جفت آغازگر ۶ و ۷) با استفاده از نرم‌افزار Primer select و Oligoanalyzer طراحی گردید. سنتز آغازگر توسط شرکت متابیون آلمان انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش PCR در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی ژن *CPT* در گیاه قندرون

شماره	نام آغازگر	توالی	شماره دستیابی NCBI	گونه گیاهی
1	CPTH-F	5'-TTGCGTACGTTTTGTGGGTA-3'	XM021828940.1	<i>H. brasiliensis</i>
	CPTH-R	5'-ACAGCATGCACGATCTCATC-3'	XM021828940.1	
2	CPTT-F	5'-GCTTTCGGGGAATACAACAA-3'	KM401657.1	<i>T. kok-saghyz</i>
	CPTT-R	5'-TATGAGCCCCTAAGGATTGC-3'	KM401657.1	
3	CPTE1-F	5'-ACCCGGTGAAGGCTACAGAG-3'	JX564541.2	<i>E. characias</i>
	CPTE1-R	5'-CCGCCATTTGAATTCCACACT T-3'	JX564541.2	
4	CPTE2-F	5'-CAACTTCTCCATCATCAAATCAATTAT-3'	JX564541.2	<i>E. characias</i>
	CPTE2-R	5'-GTGCTTTTGTATTGTGTGCTTATACT-3'	JX564541.2	
5	CPTTJ-F	5'-TCGACGCCCTGATGAAGT-3'	KM401657.1	<i>T.kok-saghyz</i>
	CPTTJ-R	5'-TCGGGGAATACA ACAAACAG-3'	KM401657.1	
6	Ghe	5'-TTATGCCTGCTTCTTCTTCTTC-3'		<i>T. breviculatum</i>
	9hR	5'-CTGTTTGTGTATTCCCCGA-3'		
7	Gh5f	5'- ATGCAAGTGAATCCAATCATTAC-3'		<i>T. breviculatum</i>
	GhR	5' - GTAGAGTTTTTAGCAGTGGC-3'		

پس از نتیجه‌گیری دلخواه از توالی‌یابی، کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار کروماتس (Chromas v 2.6.2) اعتبارسنجی و اصلاح شد. در ادامه توالی با پایگاه داده NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استفاده از ابزار BLASTn مقایسه شدند و نتیجه هم‌ردیفی بیشترین شباهت را به گیاه *Taraxacum breviculatum* نشان داد. توالی کامل *CPT1* از این گیاه از پایگاه داده دریافت شد و در مقایسه با نواحی به‌دست‌آمده از توالی‌یابی و با استفاده از نرم‌افزار Primer select و Oligoanalyzer از نواحی ابتدایی و انتهایی این ژن آغازگر تهیه گردید (جفت آغازگرهای ۶ و ۷ جدول ۱). پس از انجام PCR و دریافت باندهای دوم و سوم از ابتدا و انتهای ژن، مجدداً برای توالی‌یابی ارسال گردید. قطعات به‌دست‌آمده از توالی‌یابی شامل سه قطعه از ابتدا و قسمت میانی و قسمت انتهایی ژن با نواحی هم‌پوشان، با استفاده از نرم‌افزار Seqman سرهم‌بندی شد. سپس توالی کامل ثبت و پس از هم‌ردیفی، توالی‌های هم‌ولوگ از پایگاه داده NCBI برای مقایسه و رسم درخت تبارزایی، بازیابی شدند. هم‌ردیفی چندتایی با استفاده از روش CLUSTALW در نرم‌افزار BioEdit v 7.0.9.0 انجام شد. درخت تبارزایی بر اساس ماتریکس فاصله پارامتر Kimura 2+G برای ژن *CPT1* با استفاده از روش Neighbor joining در Mega v 7.0 تولید شدند.

در واکنش PCR از مسترمیکس (شرکت آمپلیکون ساخت دانمارک) استفاده گردید. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و همچنین موجود در منابع علمی انجام گرفت. برای انجام PCR، با در نظر گرفتن حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، از نمونه DNA با غلظت ۱۰۰ نانومول و آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول هر کدام به حجم یک میکرولیتر استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس شرکت آمپلیکون اضافه و مابقی تا حجم ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. تمامی مواد در طول آماده‌سازی روی یخ قرار داشتند. برای تکثیر قطعه‌ی مورد نظر دستگاه بایورد مدل T100 به کار گرفته شد. مدت‌زمان واسرشته‌سازی اولیه ۵ دقیقه و واسرشته‌سازی ثانویه ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، دمای اتصال بسته به توالی آغازگر از ۵۶.۵ درجه تا ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله گسترش به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه تنظیم شد. سه مرحله اخیر به تعداد ۳۵ بار تکرار گردید. در ادامه گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ انجام شد.

#### توالی‌یابی، هم‌ردیفی و روابط تبارزایی

پس از انجام PCRهای متعدد و دستیابی به اولین باند مطلوب، محصول PCR جهت انجام توالی‌یابی برای شرکت بیومجیک (<https://www.bmgtechno.com>) ارسال شد.

## نتایج و بحث

شناسایی ژن *CPT* در گیاه قندرون

پس از سرهم‌بندی قطعات به‌دست‌آمده، قطعه‌ای از توالی کامل ژن *CPT* به طول ۹۲۷ نوکلئوتید به دست آمد. توالی کامل این ژن در پایگاه داده‌ی NCBI به شماره دستیابی توالی نوکلئوتید OR539928 و توالی پروتئینی WNZ34106 ثبت گردید. مقایسه توالی نوکلئوتیدی با پایگاه داده نشان می‌دهد که این قطعه تکثیر یافته دارای ناحیه کامل کدکنندگی بوده و اینترون ندارد. ساختار پروتئین به‌دست‌آمده از ترجمه‌ی توالی نوکلئوتیدی شامل ۳۰۸ آمینواسید و وزن تقریبی ۳۵ کیلو دالتون را نشان می‌دهد که غنی از لوسین و گلاسین به

ترتیب ۹ و ۸ درصد است. ایزولوسین، لیزین، گلوتامیک اسید و والین در جایگاه بعدی فراوانی اسیدآمینه‌ای قرار دارند. نتیجه هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی این ژن در شکل ۳ آورده شده است. مقایسه‌ی توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ی حاصل در بانک جهانی ژن، شباهت زیادی را با آنزیم‌های سیس پرنیل ترانسفراز سایر گیاهان نشان می‌دهد، به‌طوری‌که از نظر توالی نوکلئوتیدی بیشترین شباهت را با آنزیم *CPT1* از گیاه *Taraxacum brevicorniculatum* و *Taraxacum kok-saghyz* نشان می‌دهد.

	704 bits(381)	0.0	772/954(81%)	54/954(5%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCGAGTGAATCCAATCATTACTGCAGATACTTCACTGAAACAAGCACAAGACATAAGA				60
Sbjct 1	ATGCAAGTGAATCCAATCATTACTACAGATAGTTCACTGAAACTAGTGGGAAGAAGAAAGA				60
Query 61	TCAAAATGGCATGGTAGGCCAAATTCCTAGGAGGCTTAAACTCCACCATAAGAAAACTCATA				120
Sbjct 61	TCAAAATGGTAGGATCGGCAATTTCTTAGGAGGCTTAAAGCCACCTTAAAGAAAACTCGTG				120
Query 121	TTCCGTGCAATCGCCGCTCGCCCGATTCCCGAACACATCGCCCTTCACTCCTCGATGGAAAC				180
Sbjct 121	TTTCGTGTCAATGCTTCTCGCCCTATCCAGAACACATCGCCCTTCACTCCTCGATGGAAAC				180
Query 181	CGCAGGTTTCGCACGCAAAACAAGCTCTCCGAAGGCGGGGGCCACAAAAACCGGTTCTA				240
Sbjct 181	CGAAGGTTTCGCCAGGAAATGGAACCTCACAGAAGGCACAGGCCACAAAAACCGGTTCTA				240
Query 241	GCCCTCATGTGGTTCCTCAAATACTGCTGCGAGATTGGTGTAAAGTACGTTACCATTAC				300
Sbjct 241	GCACTCATGTGGTTCCTCAAATACTGCTACGAGATCGGAGTCAAGTACGTCACCATCTAC				300
Query 301	GCGTTTCAGCCTCGACAACCTCAATCGACGCCCTGATGAAGTCCAATATGTCATGGACCTG				360
Sbjct 301	GCC TTCAGCCTCGACAATTTCAATCGACGCCCTGATGAAGTCCAATACGTCATGGATTG				360
Query 361	ATGCAGGACAAGATCGAAGGCTTCTGATGCAGGACAAGATCGAAGGCTTCTTGAAGGAG				420
Sbjct 361	ATGCAAGACAAGATCGAAGGCTTCTTGA---A---A---GA---A-G---TT---A-GTA-				400
Query 421	CTTAGCATCATAAACAAGTATGGCGTTAGGGTTTTGTTTATTGGTGATCTTGATAGGCTA				480
Sbjct 401	-TTA---T-A-AACCAA-TATGGCGTTAGAGTCTTGTTCATCGGTTGATCTCGATAGGTTA				453
Query 481	TATGAGCCTGTGAGGGTTGCTGCCGAAAAGGCGATGGAAGCCACTGCTAAAAACTTACC				540
Sbjct 454	TATGAGCCCGTAAGGATTGCTGCTGAGAAGGCCATGGAAGCCACCGCTAAAAATTCAACC				513
Query 541	ACGTATCTTCTTGTATGTGTGCGCTACACTTCTTACACGAGATCCACAGTGGCGGTTTAT				600
Sbjct 514	ACGTATCTCTCGTATGTGTGCTTACACTTCTTCCCATGAAATCCACAGTGGCCATCCAC				573
Query 601	GAGGCGTGTGAGGAGAAGAGTGGGGCCA---CC---AGCATACGTTGCATGAATGGGA--				652
Sbjct 574	GAAGCTTGTGAAGAAAAGAGTGGCGCCATGGCCAAATAGCATACGGTTCATGAACGGAAAC				633
Query 653	---TT---AATGGGAAT---AT-TGGGG---GT-AAATTATGGA-G---G---GGTATAAAA				693
Sbjct 634	GGGTTTTTCAATGGAAATGGATAACCAACGTTGAATCATGGAAGTCAAGCGGTGATCAAA				693
Query 694	GTGATGGATGTTGAGAAGCATAATGATATATGGGGGTGGCTCCGGATCCGGATATTCTGGTG				753
Sbjct 694	GTGGTGGATCTTGATAAGCATAATGATACATGGGGGTGGCACCGGATCCTGATATTTAGTA				753
Query 754	AGGAGTTCAGGGGAGACCGGCTGAGTAATTTTCTGCTGTGGCAGACCACAAACTGCTTG				813
Sbjct 754	CGGAGCTCCGGCGAGACAAGGCTGAGCAACTTTTCTGCTGTGGCAAAACCACCAACTGTTG				813
Query 814	TTGTATTCCTCCCAAAGCCTTGTGGCCGGAGATGGGGTTCTGGCAGGTGGTTTGGGGGATC				873
Sbjct 814	TTGTATTCCTCCCAAAGCCTTGTGGCCGGAGATGGGGTTCTGGCAGGTGGTTTGGGGAAATC				873
Query 874	TTGGAGTTTCAGAACAACTATAACTTGGGAGAGAAGAAGAAGCAGGCATAA				927
Sbjct 874	TTGGAGTTTCAGAACAACTATAACTTGGGAGAGAAGAAGAAGCAGGCATAA				927

شکل ۳- نتیجه هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن *CPT1* از گیاه *Chondrilla juncea* (query)

و مقایسه آن با ژن *CPT1* از *Taraxacum brevicorniculatum* (shjct)

این ژن می‌توان نشان داد که شباهت ۹۹ درصدی با خانواده ژنی *CPT* در جنس *Taraxacum* وجود دارد. تاکنون ۳۱ ژن از خانواده *CPT* در گیاهان مختلف شناسایی شده است اما فقط ژن *CPT1*، *CPT2* و *CPT3*

## رسم درخت تبارزایی (فیلوژنیک Phylogeny)

جهت تأیید هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی و همچنین بررسی روابط خویشاوندی در بین ژن‌های مشابه، درخت تبارزایی رسم گردید (شکل ۴). با توجه به درخت تبارزایی



*RubCPT1* بیشترین بیان را در شیرابه درخت لاستیک دارد (Uthup *et al*, 2016).

مسئول ساخت زنجیره‌ی بلند در درخت لاستیک طبیعی است که تفاوت چندانی از لحاظ توالی باهم ندارند، آنالیز ساختار توالی‌ها نشان داده است که ژن *CPT1* یا همان



شکل ۴- درخت تبار زایی ژن *CPT1* در گیاه قندرون و گیاهان با توالی مشابه، توالی نوکلئوتیدی ژن *CPT1* به دست آمده در این مطالعه شباهت ۹۹ درصدی با خانواده ژنی *CPT* در گیاه *Taraxacum breviculatum* و همچنین *T. kok-saghyz* نشان می‌دهد.

اسیدآمینهای با ژن‌های مشابه در گیاهان دیگر که با استفاده از روش ClustalW انجام شده (شکل ۵)، شباهت زیاد از لحاظ توالی را نشان می‌دهد. نواحی مشخص شده در شکل ۵ تفاوت آشکار از لحاظ توالی بین گونه‌ها نشان می‌دهد. ناحیه شماره I تفاوت توالی در ابتدای ژن در خانواده Asteraceae و Euphorbiaceae را به خوبی نشان می‌دهد، همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود در خانواده Asteraceae و همچنین گیاه قندرون یک قطعه اضافی در ابتدای ژن وجود دارد. ناحیه شماره II ناحیه اضافی در ژن *CPT1* در گیاه قندرون نسبت به سایر توالی‌ها مشاهده می‌شود. ناحیه شماره III تفاوت‌های پراکنده در هر دو خانواده گیاهی دیده می‌شود.

#### ارزیابی توالی پروتئینی در مقایسه با پایگاه داده

بررسی توالی پروتئینی در پایگاه داده InterPro برای توالی مورد نظر ۸ جایگاه و ۴ الگوی حفاظت شده نشان داد. نتایج نشان می‌دهد که اسیدآمینهای شماره ۵۲ تا ۲۹۶ شامل دومین حفاظت شده با شماره دستیابی IPR001441 و cd00475 فعالیت سیس ایزوپرنیل دی فسفات سنتازی دارد. این دومین وظیفه‌ی کاتالیز متوالی از واحدهای IPP به صورت سیس یا ترانس فارنسیل دی فسفات (FPP) را دارد که باعث تشکیل پلی پرنیل دی فسفات‌های با زنجیره‌ی بلند می‌گردد. اسیدآمینهای شماره ۲۴۸ تا ۲۶۵ ناحیه حفاظت شده با شماره دستیابی IPR018520 و وظیفه ترانسفرازی بر عهده دارد. نتایج هم‌ردیفی توالی



شکل ۵- نتایج هم‌ردیفی توالی پروتئینی ژن *CPT1* از گیاهان *Chondrilla juncea*، *Hevea brasiliensis*، *Euphorbia characias*، *Taraxacum*

*brevicomiculatum*، *kak-saghyze* با استفاده از روش Clusal W

نواحی مشخص شده در شکل با شماره I، II و III تفاوت از لحاظ توالی بین گونه‌ها نشان می‌دهد.

درصد وزنی برآورد کردند، که به درصد وزنی در این مطالعه نزدیک است. روش استخراج آنزیمی برای ۱۰ گرم کالوس خشک انجام شد، اما از آن لاستیکی استخراج نشد که دلیل آن می‌تواند رشد ناکافی سلول‌های لاتیسفر باشد. رامیرز-کاداوید و همکاران (Ramirez-Cadavid *et al*، 2018-2019) تحقیقات جامعی بر روی فرایند استخراج لاستیک طبیعی از گیاه قاصدک روسی انجام داده‌اند و نتایج نشان داد که روش هضم آنزیمی به‌تنهایی و با استفاده از پیش‌تصفیه‌ی قلیایی و به دنبال آن هضم آنزیمی برای حذف آلاینده‌های لیگنوسولزی روش ایده‌آلی است. با توجه به کاربرد گسترده لاستیک طبیعی، یافتن جایگزین برای درخت لاستیک در مناطق غیراستوایی و مناطقی که درخت لاستیک قابل کشت نیست ضروری به نظر می‌رسد.

### استخراج لاستیک طبیعی

میانگین وزن لاستیک استخراج شده در فصل پاییز ۳/۲ درصد وزنی و در بهار ۲ درصد وزنی به‌دست آمد. اختلاف میانگین وزن لاستیک استخراج‌شده در دو فصل پاییز و بهار با استفاده از آزمون t در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. در مطالعه تاتا و همکاران (Tata *et al*، 2023) بر روی فصل برداشت محصول قاصدک روسی در کشور کره نشان داد که فصل‌های بهار و پاییز بهترین فصول برای تجمع لاستیک است اما به دلایل متعدد برداشت محصول در انتهای پاییز یا انتهای زمستان بهترین راهبرد جهت کشت اقتصادی محصول است. وایلن و بوآیر (Van Beilen and Poirier، 2007) در تحقیقات خود، عدد وزنی لاستیک استخراج شده از گیاهان وحشی تاراکساکوم را بین ۵ تا ۴



(Verpoorte *et al*, 2002; Naik and Al-Khayri, 2016). پس از آزمایش امکان‌سنجی استخراج لاستیک در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی مطالعه بر روی ژن‌های دخیل در بیوسنتز لاستیک طبیعی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه به استفاده از آغازگرهای متعدد و توالی‌یابی قطعات به‌دست‌آمده، توالی کامل ژن کلیدی *CPT* از DNA ژنومی به دست آمد و تحت شماره‌ی دستیابی OR539928 در پایگاه داده‌ی نوکلئوتیدی NCBI به ثبت رسید. هم‌ردیفی این توالی و مقایسه آن با سایر توالی‌ها بیشترین شباهت را به خانواده‌ی ژنی *CPT* در جنس *Taraxacum* و گونه *Breviculatum* را نشان داد که شباهت آن در قالب درخت تبارزایی در شکل ۲ نشان داده شده است. پروتئین‌هایی که روی غشای اجسام کوچک لاستیک طبیعی حضور دارند، شامل REF، SRPP و *CPT* هستند، فرضیه بر این اساس وجود دارد که کمپلکس ترانسفراز بر روی غشا لیپیدی باعث سنتز و تولید سازی زنجیره‌ی لاستیک طبیعی رو به داخل غشا و قسمت آب‌گریز آن می‌شود (Dai *et al*, 2013; Brown *et al*, 2017; Salehi *et al*, 2021). افزایش کاهش بیان پروتئین *CPT* نقش کلیدی بر روی افزایش طول زنجیره و تجمع لاستیک در حضور غلظت بالای IPP بر عهده دارند (Cherian *et al*, 2019). بررسی توالی اسیدآمینو به‌دست‌آمده و مقایسه‌ی آن با سایر توالی‌های مشابه دو تفاوت عمده را در ساختار توالی اسیدآمینو‌ای در نواحی میانی ژن نشان می‌دهد. اولین تفاوت مربوط به قطعه‌ای شامل ۹ اسیدآمینو است که نسبت به سایر توالی‌ها اضافه است و به‌نوعی الحاق توالی صورت گرفته است که برای مشخص شدن تغییرات عملکردی در ژن نیاز به بررسی‌های بیشتر است. ناحیه دوم شامل قسمت‌هایی هست که شباهت بیشتری به *Euphorbia characias* و شباهت کمتر به سایر گونه‌ها دارد. اسکلت کربنی اکثر ایزوپرنوئیدها از نوع ترنس پرنیل ترانسفراز است که دو ناحیه عملکردی شامل موتیف غنی از آسپارژین را دارا می‌باشد و پلیمرهای آللیک خطی با ۱۰ تا ۵۰ واحد ایزوپرن را سنتز می‌کند (Wallrapp *et al*, 2013). پلیمریازسیون واحدهای IPP با سایت کاتالیکی حفاظت‌شده در آنزیم پرنیل ترانسفراز انجام می‌شود. سپس پرنیل ترانسفرازها پیوندهای آللیک شامل پلی‌پرنیل‌های ۱۰ کربنه تا ۱۰ هزار کربنه شامل لاستیک طبیعی را سنتز می‌کند (Grabińska *et al*, 2016).

با استناد به پژوهش حاضر می‌توان گیاه قندرون را به‌عنوان یک جایگزین بالقوه در نظر گرفت. تفاوت آناتومی و فیزیولوژیک این گیاه با درخت لاستیک لزوم بهینه‌سازی روش استخراج ساده و اقتصادی را برای این ماده باارزش ضروری می‌سازد. استفاده از مواد قلیایی و آنزیم‌های سلولیتیک به‌عنوان روش پیشنهادی در این پژوهش بررسی شد و نتایج نشان داد درصد قابل‌توجهی لاستیک طبیعی قابل استخراج است. درصد لاستیک به‌دست‌آمده در این مطالعه با مطالعات سیکندر و همکاران (Sikandar *et al*, 2017) که برای قاصدک روسی انجام شده مطابقت دارد. در مطالعه‌ی بورانوف و الموردوف (Buranov, 2010) و Elmuradov & از دو روش استفاده از حلال‌های قطبی و غیر قطبی و روش همزن (مکانیکی) برای استخراج لاستیک از گیاه استفاده کرده‌اند، که روش حلال درصد بیشتر و باکیفیت بالاتری از لاستیک را توانست استخراج کند. در مطالعه پیش رو اولویت، استفاده از روش ساده‌تر و ارزان‌قیمت‌تر مدنظر قرار گرفت. اما در روش استفاده از حلال‌های شیمیایی و روش له کردن، محصولات جانبی از جمله مواد کربنی و رزین نیز جدا می‌شود که مواد باارزشی محسوب می‌شود (Sproul *et al*, 2020).

در آزمایش استخراج لاستیک تجمع لاستیک در ریشه گیاه در فصل پاییز ۳/۲ درصد وزنی و در بهار ۲ درصد ارزیابی شد. در تحقیقات انجام شده بر روی گیاه گواپول تولید لاستیک طبیعی در این گیاه به‌صورت دوره‌ای در طبیعت انجام می‌شود و تغییرات محیطی در تولید و تجمع لاستیک طبیعی نقش بالقوه‌ای دارد. نشان داده شده است که تجمع لاستیک در کمترین حالت خود در دوره‌ی رویشی انجام می‌شود و حداکثر ذخیره‌سازی این ماده در پاییز و زمستان اتفاق می‌افتد (Stonebloom & Scheller, 2019). در تحقیق حاضر در کالوس‌های با عمر دو ماه در محیط کشت MS همراه هورمون NAA و BA لاستیک طبیعی استخراج نگردید و یا مقدار آن بسیار ناچیز بود. با توجه به مثبت نبودن وجود لاستیک در کالوس، استخراج لاستیک از سوسپانسیون سلولی انجام نشد. متابولیت‌های ثانویه معمولاً برای گیاه میزبان سمی هستند، بنابراین در سلول‌های تخصص‌یافته‌ای مثل تریکوم‌ها و ساختارهای ثانویه انتقال و لایسفرها تجمع پیدا می‌کند (Pickard, 2008; Duke, 1994). سلول‌های تمایزنیافته مثل کالوس معمولاً حاوی مقدار بسیار کمی از متابولیت‌های ثانویه است

طبیعی یافتن جایگزین برای این ماده‌ی با ارزش ضروری به نظر می‌رسد. در پژوهش حاضر با بررسی گیاه کمتر شناخته شده قندرون وجود لاستیک طبیعی در این گیاه و همچنین ژن کلیدی CPT در مسیر بیوسنتزی لاستیک طبیعی به اثبات رسیده است. بنابراین می‌توان این گیاه را به‌عنوان یک منبع بالقوه برای لاستیک طبیعی معرفی کرد.

### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

بررسی توالی پروتئینی در پایگاه داده یک دومین حفاظت شده با شماره‌ی دستیابی IPR001441 با فعالیت سیس‌ایزوپرنیل دی‌فسفات سنتاز و ناحیه حفاظت شده با شماره‌ی دستیابی IPR018520 با وظیفه‌ی ترانسفرازی را نشان می‌دهد. این دو ناحیه امکان تولید زنجیره‌ی بلند از واحدهای IPP را تأیید می‌کند. با توجه به این نتایج، بررسی بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز لاستیک طبیعی در گیاه قندرون ضروری است.

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به محدودیت‌های موجود در تأمین لاستیک

### منابع

- Aboul-Maaty, N. A. F., & Oraby, H. A. S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-10.
- Asawatreratanakul, K., Zhang, Y. W., Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R., Takahashi, S., Rattanapittayaporn, A., & Koyama, T. (2003). Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*: A key factor participating in natural rubber biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 270(23), 4671-4680.
- Brown, D., Feeney, M., Ahmadi, M., Lonoce, C., Sajari, R., Di Cola, A., & Frigerio, L. (2017). Subcellular localization and interactions among rubber particle proteins from *Hevea brasiliensis*. *Journal of experimental botany*, 68(18), 5045-5055.
- Buranov, A. U., & Elmuradov, B. J. (2010). Extraction and characterization of latex and natural rubber from rubber-bearing plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 734-743.
- Chaboudez, P. (1994). Patterns of clonal variation in skeleton weed (*Chondrilla juncea*), an apomictic species. *Australian Journal of Botany*, 42(3), 283-295.
- Cherian, S., Ryu, S. B., & Cornish, K. (2019). Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects. *Plant biotechnology journal*, 17(11), 2041-2061.
- Cornish, K. (2001). Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry*, 57(7), 1123-1134.
- Cornish, K., Castellón, J., & Scott, D. J. (2000). Rubber molecular weight regulation, in vitro, in plant species that produce high and low molecular weights in vivo. *Biomacromolecules*, 1(4), 632-641.
- da Costa, B. M., Keasling, J. D., & Cornish, K. (2005). Regulation of rubber biosynthetic rate and molecular weight in *hevea Hevea b rasiliensis* by metal cofactor. *Biomacromolecules*, 6(1), 279-289.
- Dai, L., Kang, G., Li, Y., Nie, Z., Duan, C., & Zeng, R. (2013). In-depth proteome analysis of the rubber particle of *Hevea brasiliensis* (Para rubber tree). *Plant molecular biology*, 82, 155-168.
- De Rodriguez, D. J., & Kuruvadi, S. (1991). Comparison of Soxhlet and homogenizer extraction methods to determine rubber and resin content of Mexican guayule plants. *Bioresource technology*, 35(2), 179-183.
- Duke, S. O. (1994). Glandular trichomes—a focal point of chemical and structural interactions. *International Journal of Plant Sciences*, 155(6), 617-620.
- Grabińska, K. A., Edani, B. H., Park, E. J., Kraehling, J. R., & Sessa, W. C. (2017). A conserved C-terminal RXG motif in the NgBR subunit of cis-prenyl transferase is critical for prenyl transferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(42), 17351-17361.
- Grabińska, K. A., Park, E. J., & Sessa, W. C. (2016). Cis-Prenyltransferase: new insights into protein glycosylation, rubber synthesis, and human diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18582-18590.
- Martinez, M. E., Jorquera, L., Poirrier, P., Díaz, K., & Chamy, R. (2021). Effect of the carbon source and plant growth regulators (PGRs) in the induction and maintenance of an in vitro callus culture of *Taraxacum officinale* (L) weber Ex FH Wigg. *Agronomy*, 11(6), 1181.
- Mozaffarian, V. (1996). A dictionary of Iranian plant names. Tehran: Farhang Moaser, 396, 396-8. (In persian).
- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. *Abiotic and biotic stress in plants—recent advances and*

- future perspectives. Rijeka: InTech, 247-277.*
- Pickard, W. F. (2008). Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. *New Phytologist*, 177(4), 877-888.
- Ramirez-Cadavid, D. A., Cornish, K., Hathwaik, U., Kozak, R., McMahan, C., & Michel Jr, F. C. (2019). Development of novel processes for the aqueous extraction of natural rubber from *Taraxacum kok-saghyz* (TK). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(8), 2452-2464.
- Ramirez-Cadavid, D. A., Valles-Ramirez, S., Cornish, K., & Michel Jr, F. C. (2018). Simultaneous quantification of rubber, inulin, and resins in *Taraxacum kok-saghyz* (TK) roots by sequential solvent extraction. *Industrial crops Crops and productsProducts*, 122, 647-656.
- Salehi, M., Cornish, K., Bahmankar, M., & Naghavi, M. R. (2021). Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of *Taraxacum kok-saghyz*. *Industrial Crops and Products*, 170, 113667.
- Schmidt, T., Hillebrand, A., Wurbs, D., Wahler, D., Lenders, M., Schulze Gronover, C., & Prüfer, D. (2010). Molecular cloning and characterization of rubber biosynthetic genes from *Taraxacum koksaghyz*. *Plant molecular Molecular biology Biology reporterReporter*, 28, 277-284.
- Sikandar, S., Ujor, V. C., Ezeji, T. C., Rossington, J. L., Michel Jr, F. C., McMahan, C. M., & Cornish, K. (2017). *Thermomyces lanuginosus* STm: A source of thermostable hydrolytic enzymes for novel application in extraction of high-quality natural rubber from *Taraxacum kok-saghyz* (Rubber dandelion). *Industrial Crops and Products*, 103, 161-168.
- Spanò, D., Pintus, F., Esposito, F., Loche, D., Floris, G., & Medda, R. (2015). *Euphorbia characias* latex: micromorphology of rubber particles and rubber transferase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87, 26-34.
- Sproul, E., Summers, H. M., Seavert, C., Robbs, J., Khanal, S., Mealing, V., & Quinn, J. C. (2020). Integrated techno-economic and environmental analysis of guayule rubber production. *Journal of Cleaner Production*, 273, 122811.
- Stonebloom, S. H., & Scheller, H. V. (2019). Transcriptome analysis of rubber biosynthesis in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *BMC plant Plant biologyBiology*, 19, 1-10.
- Tata, S. K., Hong, S. B., Bae, S. W., Park, J. C., & Ryu, S. B. (2022). Seasonal Variation variation of Rubber rubber Production production in Russian Dandelion, *Taraxacum kok-saghyz*, Grown grown in Korea. *Korean Journal of Plant Resources*, 35(3), 399-404.
- Uthup, T. K., Rajamani, A., Ravindran, M., & Saha, T. (2019). Distinguishing CPT gene family members and vetting the sequence structure of a putative rubber synthesizing variant in *Hevea brasiliensis*. *Gene*, 689, 183-193.
- Van Beilen, J. B., & Poirier, Y. (2007). Establishment of new crops for the production of natural rubber. *TRENDS in Biotechnology*, 25(11), 522-529.
- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1, 13-25.
- Wallrapp, F. H., Pan, J. J., Ramamoorthy, G., Almonacid, D. E., Hillerich, B. S., Seidel, R., & Poulter, C. D. (2013). Prediction of function for the polyprenyl transferase subgroup in the isoprenoid synthase superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 1196-1202.

## Identification of the key CPT1 gene in natural rubber biosynthetic pathway in *Chodrilla juncea* and extraction of rubber by enzymatic method

Benyamin Jalili <sup>1</sup>, Asghar Mirzaie-Asl <sup>2\*</sup>, Hedayat Bagheri <sup>2</sup>

1. Ph.D. student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

Received: 09-08-2024

Accepted: 28-09-2024

### Abstract

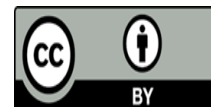
Natural rubber is a vital material for the industry, which is usually obtained from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Considering that it is not possible to grow this tree in many areas, it seems necessary to find an alternative source for this valuable material. In this study, the presence of natural rubber in the Ghandaroun plant with the scientific name *Chodrilla juncea* was investigated from a molecular and biochemical point of view. The results showed that a significant amount of natural rubber can be extracted from the roots of this plant in the autumn season by using the enzyme method. Also, in the present study, the key gene of cis-prenyl transferase (CPT) involved in the biosynthesis of natural rubber was identified and sequenced using different primers on the genomic DNA of this plant. After assembling the sequences obtained, the complete sequence of this gene was obtained. Comparing the nucleotide and protein sequences of this gene showed a great similarity to the CPT gene in other plants of this family and even the rubber tree. This article represents the first report of natural rubber production in Ghandaroun plant. Further investigations and breeding programs, it may position this plant as a novel commercial source for natural rubber production.

**Keywords:** Cis-prenyl, transferase, ghandaroun, rubber tree, sequencing

**Citation:** Jalili, B., Mirzaie-Asl, A., & Bagheri, H. (2024). Identification of the key CPT1 gene in natural rubber biosynthetic pathway in *Chodrilla juncea* and extraction of rubber by enzymatic method. *Plant Production and Genetics*, 5(2), 287-298. <https://doi.org/10.22034/plant.2024.141894.1119>

#### Copyrights:

Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



\*Corresponding Author Email: [a.mirzaie@basu.ac.ir](mailto:a.mirzaie@basu.ac.ir)