



بررسی بیان ژن های UGT76G1 و UGT85C2، KA13H در مراحل مختلف رشدی استویا

نرگس معروف^۱، امیر محمد ناجی^{۲*}، داریوش طالعی^۲

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد

۲-استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد

Email: nargess.maroof@shahed.ac.ir

چکیده

آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی به منظور بررسی بیان ژن های کائورنیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز (KA13H)، یوریدین دی فسفات گلیکوزیل ترانسفرازهای UGT76G1 و UGT85C2 در گیر در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویول به روش نیمه کمی و مقدار قند ریبودیوزاید در مراحل مختلف رشدی بر روی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) انجام شد. نتایج آزمایش نشان داد که بین مراحل مختلف رشدی از نظر میزان قند ریبودیوزاید تفاوت معنی داری وجود دارد به طوری که کمترین میزان قند در مرحله گلدهی و بیشترین میزان قند در مرحله توسعه یافته بود. همچنین نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن های UGT76G1، UGT85C2، KA13H و نشان داد که بیشترین مقدار بیان مربوط به ژن UGT85C2 در مرحله توسعه یافته و کمترین مقدار بیان مربوط به ژن UGT76G1 در مرحله گلدهی می باشد. نتایج نشان داد که همبستگی مثبت و معنی داری بین مقدار قند ریبودیوزاید با بیان ژن UGT85C2 و همچنین بین بیان ژن KA13H و UGT76G1 وجود دارد. کمترین میزان همبستگی نیز بین بیان ژن KA13H و UGT85C2 مشاهده شد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، ریبودیوزاید، استویا ریبودیانا، استویول گلیکوزید، HPLC.

۱. مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* از خانواده Asteraceae گیاهی چندساله، بوته ای با تعداد کروموزوم $2n=2x=22$ بومی مناطق آمریکای جنوبی و یکی از مهمترین گیاهان دارویی به شمار می رود (۱۲). استویا گیاهی خودناسازگار بوده و احتمالاً توسط حشرات گرده افشانی می کند. میزان خودگشنی استویا کمتر از نیم درصد می باشد. این گیاه به شیرین برگ یا برگ عسلی نیز معروف است. زیرا بیشترین میزان گلیکوزیدهای قندی در برگ ها تجمع یافته است (۲). اخیراً به سبب شیوع چاقی و دیابت تمایل بشر به استفاده از شیرین کننده های طبیعی و بدون کالری افزایش یافته است. گلیکوزیدهای قندی موجود در استویا به عنوان یک شیرین کننده طبیعی فاقد کالری جایگزین مناسبی برای قندهای مصنوعی محسوب می شود (۹). شیرینی استویا حدود ۲۵۰-۳۰۰ برابر نیشکر و چغندر قند می باشد. قندهای استویا بدون تجزیه شیمیایی از دستگاه گوارش عبور می کند و به همین سبب تأثیری بر سطح گلوکز خون و میزان ترشح انسولین نمی گذارد. از این رو افراد دیابتی با خیال راحتتر می توانند از این شیرین کننده طبیعی استفاده کنند (۴). دو گلیکوزید اصلی موجود در برگ های گیاه استویا، استویوزاید و ریبودیوزاید نام دارند که به طور معمول استویوزاید حدود ۵-۱۰٪ و ریبودیوزاید حدود ۲-۴٪ از وزن خشک برگ ها را تشکیل می دهند (۳). تولیدکنندگان اصلی استویا کشورهای ژاپن، چین، تایلند، مالزی، برزیل و پاراگوئه می باشند. استویا علاوه بر خاصیت شیرین کنندگی، دارای اثرات دارویی مهمی همچون خاصیت ضد دیابتی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و قارچی، ضد فشار خون، بازدارنده از پیشرفت سرطان و HIV، ضد اسهال، ادرارآور و تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن می باشد (۵). اسکلت اصلی که مولکول گلوکز روی آن متصل می شود، مولکول استویول است که شبیه اسکلت انت-کائورن برای سنتز جیبرلین می باشد. ساخت اسکلت کائورن در کلروپلاست و هیدروکسیله شدن آن توسط آنزیم KA13H روی شبکه آندوپلاسمی زبر صورت می گیرد. گلیکوزیل ترانسفرازهایی که در سیتوزول مستقر هستند، چند قند به استویول اضافه می کنند. ژن های مهم و اختصاصی



استویا درگیر در بیوسنتز استویول گلیکوزید شامل کائورن اکسیداز (KO)، کائورنیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز (KAH13)، یوریدین دی فسفات گلیکوزیل ترانسفرازهای UGT74G1, UGT85C2 و UGT76G1 می باشد. سایر ژن های این مسیر با سنتز جیبرلین مشترک می باشند (۷).

بیان ژن های مهم درگیر در مسیرهای بیوسنتزی در مراحل مختلف رویش گیاهان متفاوت می باشد. تغییر در سطح بیان ژن ها باعث تفاوت در میزان تولید متابولیت های ثانویه توسط گیاه در دوره های مختلف رشدی آن می شود. متابولیت های ثانویه مهم در استویا نیز گلیکوزیدهای قندی موجود در برگ های گیاه می باشد (۱). در پژوهش طهماسی و همکاران (۲۰۱۷) به این نتیجه رسیدند که افزودن غلظت های مختلف اسیدسالیسیلیک اثرات متفاوتی بر تولید استویوزاید و ریودیوزاید دارد. همچنین اسیدسالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن های KA13H و UGT74G1 و کاهش بیان ژن UTG76G1 شد (۸). در پژوهشی رسولی و همکاران (۲۰۱۸) تاثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی را بر بیان ژن های KO, UGT85C2, UGT74G1 و UGT76G1 در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویا بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیان ژن های UGT85C2 و UGT76G1 در گیاهان تحت تیمار کیتوزان در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر در مقایسه با گیاهان شاهد (۱۶ و ۵ درصد) افزایش یافت. همچنین متیل جاسمونات با غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر باعث بالا رفتن بیان ژن KO در مقایسه با گیاه شاهد (۱۳٪) شد. عصاره مخمر در غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر باعث افزایش بیان ژن UGT85C2 و UGT76G1 با مقادیر ۱۱ و ۵ درصد شد. به طور کلی کیتوزان و متیل جاسمونات در غلظت های کم و عصاره مخمر در غلظت متوسط می توانند باعث افزایش بیان ژن های مرتبط با بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول شوند (۶). مطالعه کریستانا هرناندز و همکاران (۲۰۱۹) تاثیر برخی از الیستورهای غیر زنده بر بیان ژن های UGT74G1, UGT76G1, UGT85C2 و KAH13 را نشان داد. همه این الیستورها خصوصاً سالیسیلیک اسید با غلظت ۰/۱ درصد باعث افزایش محتوای استویول گلیکوزیدها و افزایش بیان ژن های مرتبط با مسیر بیوسنتزی این ترکیبات و همچنین افزایش تعداد برگ های استویا شدند (۱۰). در این پژوهش میزان بیان ژن های KA13H, UGT85C2 و UGT76G1 و همچنین محتوای قند ریودیوزاید در پنج مرحله رشدی شامل هشت برگی، در حال توسعه، توسعه یافته، قبل گلدهی و گلدهی با سه تکرار بررسی شد.

۲. مواد و روش ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد انجام شد. از توده زرگیاه استویا تهیه شده از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد به عنوان ماده گیاهی استفاده شد. بذر گیاه در گلدان های حاوی پومیس کشت و پس از سبز شدن در طی مراحل رشد با استفاده از محلول کامل هوگلند به طور مرتب آبیاری شد. نمونه برداری در مراحل رشدی مختلف از جمله: هشت برگی، در حال توسعه، توسعه یافته، قبل گلدهی و گلدهی انجام شد (شکل ۱). نمونه های برگ با بلافاصله به ازت مایع منتقل شده و تا زمان استخراج RNA در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. استخراج RNA مطابق روش زارعی و همکاران (۲۰۱۲) از برگ های گیاه استویا در مراحل مختلف رشدی انجام شد (۱۳). به منظور حذف آلودگی های DNA نمونه ها از تیمار DNase I استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و خوانش اسپکتروفتومتری ۲۶۰، ۲۸۰، ۲۳۰ نانومتری در دستگاه نانودراپ (USA, 2000c ThermoScientific) مورد بررسی قرار گرفت. تهیه cDNA با استفاده از آنزیم MMLV تهیه شده از شرکت Biofact کره و طبق دستورالعمل شرکت تهیه کننده انجام شد. طراحی آغازگرها برای ژن های KA13H, UGT85C2, UGT76G1 و ژن خانه دار اکتین با توجه به اطلاعات ژنومی موجود در NCBI و با نرم افزار Oligo 7 انجام شد (جدول شماره ۱). شرایط انجام PCR به صورت: واسرشته سازی اولیه ۵ دقیقه با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، واسرشته سازی با ۳۵ چرخه به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، جفت شدن آغازگرها ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای تمامی ژن ها، طولیل شدن ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و بعد از آن گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. محصول PCR در ژل یک درصد آگارز با اختلاف پتانسیل ۹۰ ولت الکتروفورز گردید (شکل ۲). به منظور تجزیه و تحلیل نیمه کمی تصاویر به دست آمده از ژل الکتروفورز از نرم افزار Image Lab استفاده شد و غلظت تکثیر هر نمونه محاسبه شد. داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شد. استخراج ریودیوزاید از اندام های هوایی گیاهان در مراحل مختلف رشدی بر اساس روش Woelwer-Rieck و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد (۱۱). این نمونه های آماده شده به دستگاه HPLC تزریق شدند. پیک ریودیوزاید با استفاده از استاندارد شناسایی شدند و زمان نگهداری و مساحت اوج ثبت شد (شکل ۳). تجزیه و تحلیل داده های حاصل از این مرحله نیز با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹.۴ انجام شد. برای مشخص کردن معنی دار بودن تفاوت ها بین گروه ها از آزمون LSD در سطح احتمال $P \leq 0/05$ استفاده شد.



هفتمین کنفرانس ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران

جدول ۱: توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شده در واکنش PCR، دمای ذوب و اتصال

ژن	شماره دسترسی	آغازگر	(3'-5') توالی	دمای ذوب (°C)	دمای اتصال (°C)	طول قطعه قابل تکثیر (bp)
KA13H	EU722415.1	F R	GAAAGAAGGGAAGGCATCATC CCCGCAAAGAGTAGTAACAAG	۵۹ ۵۹	۶۰	۱۱۹
UGT76G1	AY345974.1	F R	GAACACGGAGCTGACGAATTA TTGCGCGAAGTACCAAAGA	۵۹ ۵۵	۶۰	۱۲۴
UGT85C2	AY345978.1	F R	CATCGAGAGCTTGTCTGC TTCACCTTGGTTCCCATCTC	۵۶ ۵۶	۶۰	۱۲۳
ACTIN	AF548026.1	F R	TCTGTTCCAACCGTCTTTG CCACTGAGCACGATGTTAC	۵۵ ۵۷	۶۰	۱۲۴



هشت برگی

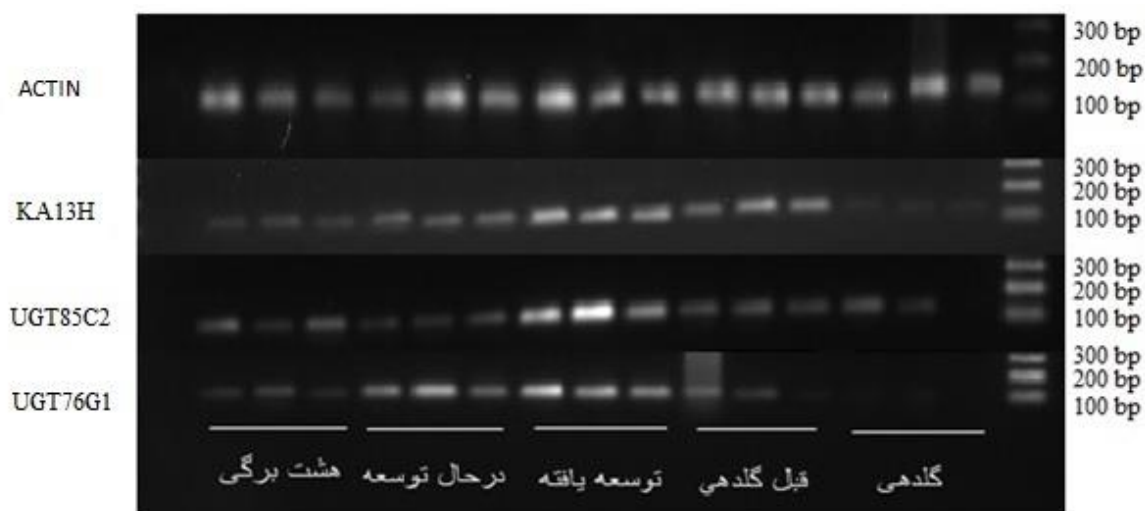
در حال توسعه

توسعه یافته

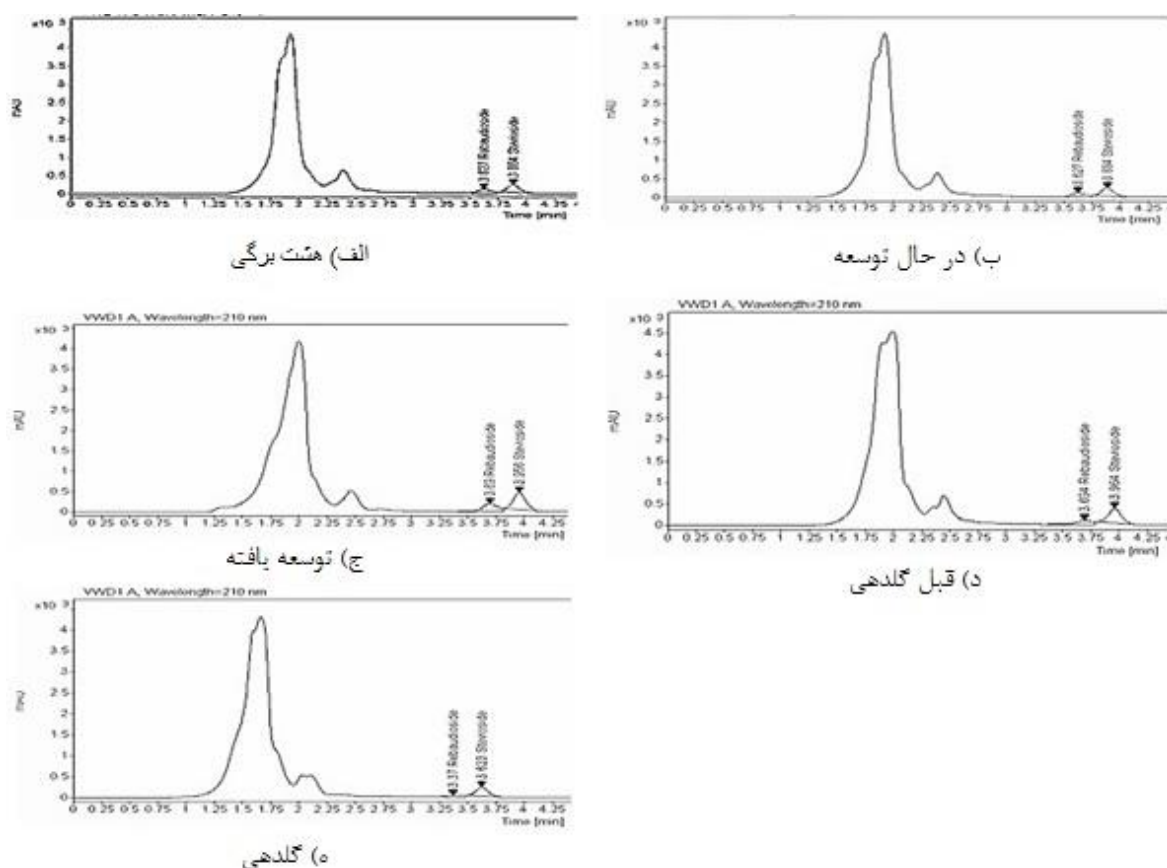
قبل گلدهی

گلدهی

شکل ۱: گیاه استویا در مراحل مختلف رشد



شکل ۲: ژن های کائورنیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز (KA13H)، یوریدین دی فسفات گلیکوزیل ترانسفرازهای UGT76G1 و UGT85C2 و ژن خانه دار اکتین بیان شده در مراحل مختلف رشدی



شکل ۳: نمودار میزان قند ریبودیوزاید در مراحل مختلف رشدی

۳. نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی داری بین میزان ریبودیوزاید در مراحل مختلف رشدی گیاه استویا وجود دارد (جدول شماره ۲). همچنین مقایسه میانگین های حاصل نشان داد که بیشترین میزان قند ریبودیوزاید در مرحله توسعه یافته با ۲/۶۷ درصد و کمترین مقدار در مرحله گلدهی با ۰/۶۸ درصد می باشد. اگرچه اختلاف معنی داری بین مرحله هشت برگی و قبل گلدهی وجود ندارد. همچنین نتایج تجزیه واریانس در مراحل مختلف رشدی به منظور بررسی میزان بیان ژن های KA13H، UGT76G1 و UGT85C2 در استویا نشان داد که میزان بیان ژن های مورد مطالعه در مراحل مختلف تفاوت معنی داری داشتند. طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین بیشترین میزان بیان ژن های KA13H، UGT76G1 و UGT85C2 در مرحله توسعه یافته به ترتیب با مقدار ۱/۳۶، ۱/۴۳ و ۱/۴۱ و کمترین میزان بیان ژن KA13H در مرحله گلدهی با مقدار ۰/۲۸ بوده که با مرحله هشت برگی تفاوت معنی داری نداشته، ژن UGT85C2 در مرحله گلدهی با مقدار ۰/۲ بوده و با مراحل هشت برگی، در حال توسعه و قبل گلدهی تفاوت معنی داری ندارد و ژن UGT76G1 در مرحله گلدهی با مقدار ۰/۰۴ مشاهده شد (نمودار شماره ۱). همچنین مقایسه میانگین حاصل از بررسی بیان ژن KA13H، UGT76G1 و UGT85C2 نیز نشان داد که با تغییر مرحله رشدی میزان بیان ژن روند یکسانی نداشته است.

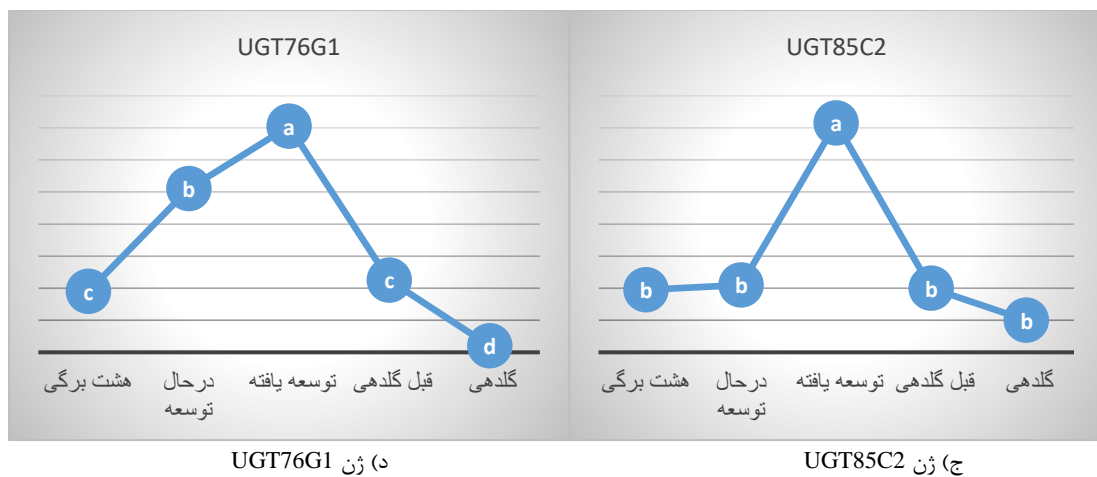
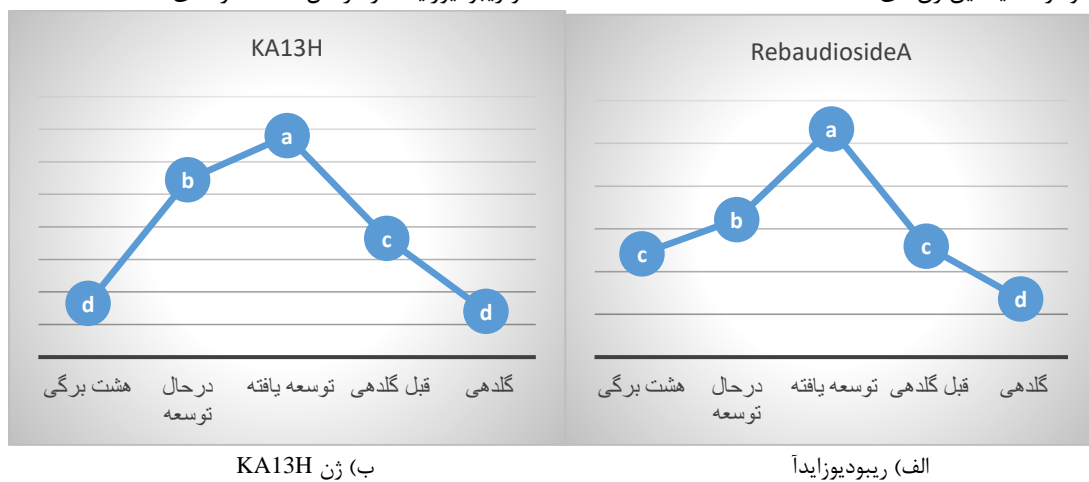


جدول ۲: تجزیه واریانس ریپودیوزاید آ و ژن های UGT85C2, UGT76G1, KA13H میانگین مربعات

Rebaudioside A	UGT76G1	UGT85C2	KA13H	درجه آزادی	منابع تغییرات
۱/۶۳**	۰/۹**	۰/۷۱۴**	۰/۶۶**	۴	مرحله رشدی
۰/۰۱۱	۰/۰۰۸	۰/۰۱۴	۰/۰۰۳	۱۰	خطا
۷/۱۹	۱۳/۷۴	۲۰/۷۶	۸/۱۱		(%) ضریب تغییرات

** و * به ترتیب معنی داری در سطح ۱٪ و ۵٪ و ns بدون اختلاف معنی داری

نمودار ۱: میانگین ژن های UGT76G1, UGT85C2, KA13H و ریپودیوزاید آ در مراحل مختلف رشدی

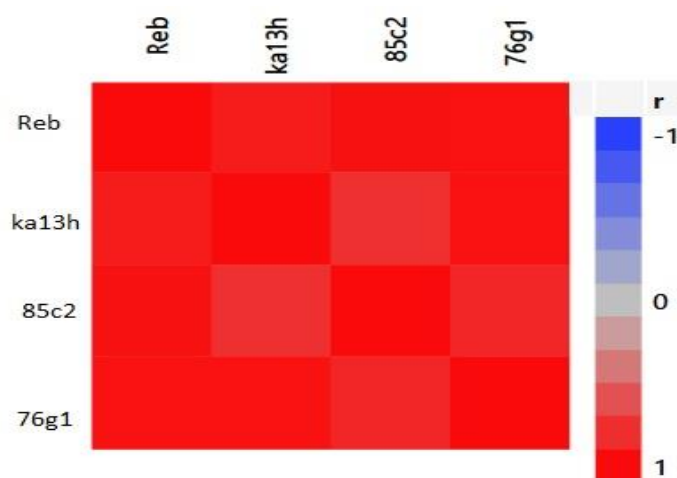




نتایج همبستگی بین محتوای قند ریبودیوزاید و بیان ژن های UGT76G1 و UGT85C2، KA13H نشان داد که بیشترین میزان همبستگی به ترتیب بین ریبودیوزاید و ژن UGT85C2 (۹۵٪)، ریبودیوزاید و UGT76G1 (۹۵٪) و همچنین KA13H و UGT76G1 (۹۶٪) بود. ضمناً کمترین میزان همبستگی نیز بین KA13H و UGT85C2 (۷۸٪) بود (جدول ۳).

جدول ۳: همبستگی محتوای قند ریبودیوزاید و بیان برخی از ژن های در مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزاید

UGT76G1	UGT85C2	KA13H	RebaudiosideÅ	
۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۰	۱	RebaudiosideÅ
۰/۹۶	۰/۷۸	۱	۰/۹۰	KA13H
۰/۸۴	۱	۰/۷۸	۰/۹۵	UGT85C2
۱	۰/۸۴	۰/۹۶	۰/۹۵	UGT76G1



شکل ۴: نقشه همبستگی محتوای قند ریبودیوزاید و بیان برخی از ژن های در مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزید (Reb=RebaudiosideÅ، 85c2=UGT85C2 و 76g1=UGT76G1).

۴. نتیجه گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد، بیشترین محتوای قند ریبودیوزاید و همچنین بیشترین میزان بیان ژن های KA13H، UGT85C2 و UGT76G1 در مرحله توسعه یافته می باشد و پس از این مرحله، محتوای قند و میزان بیان ژن های مورد مطالعه کاهش یافته، کمترین میزان قند ریبودیوزاید و ژن های مورد بررسی در مرحله گلدهی می باشد. همبستگی مثبت و معنی داری به ترتیب بین مقدار قند ریبودیوزاید و بیان ژن های UGT85C2 و UGT76G1 و ژن های KA13H و UGT76G1 مشاهده شد. همچنین کمترین میزان همبستگی بین ژن های KA13H و UGT85C2 مشاهده شد. در نتیجه بهترین مرحله جهت برداشت برگ های استویا جهت استخراج گلیکوزیدهای قندی آن در مرحله توسعه یافته می باشد.



مراجع

1. Akbari, F, A. Arminian, D. Kahrizi, A. Fazeli, and M. Ghaheri, "Effect of nitrogen sources on gene expression of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) under in vitro conditions," *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, vol. 10;64(2), pp. 11-16, Feb 2018. doi: 10.14715/cmb/2018.64.2.3.
2. Gupta. E, S. Purwar, S. Sundaram, and G. K. Rai, "Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7(46), pp. 3343-3353, 2013.
3. Kinghorn, A. D, and D. D. Soejarto, "Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 74, pp. 1169-1179, 2002.
4. Kumari. K. L, D. C. Abeyasinghe, and R. M. Dharmadasa, "Distribution of phytochemicals and bioactivity in different parts and leaf positions of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Bertoni-a non-caloric, natural sweetener," *World*, vol. 4(6), pp.162-5, 2016.
5. Lemus-Mondaca. R, A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, and K. Ah-Hen, "*Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects," *Food Chemistry*, vol. 132(3), pp. 1121-1132, 2012.
6. Rasouli. D, B. Maleki, H. Jafary, and A. Bahari, "Expression analysis of genes involed in steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni under biotic and abiotic elicitors," *Modern Genetics Scientific Quarterly*, vol. 13(2), pp. 247-257, 2018.
7. Richman. A. S, M. Gijzen, , A. N. Z. StarrattYang, and J. E. Brandle, "Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway," *The Plant Journal*, vol. 19(4), pp. 411-421, 1999.
8. Tahmasi. S, G. Garoosi, J. Ahmadi, and R. Farjaminezhad, "Effect of salicylic acid on stevioside and rebaudioside A production and transcription of biosynthetic genes in in vitro culture of *Stevia rebaudiana*," *Iranian Journal of genetics and plant breeding*, vol. 6(2), pp. 1-8, 2017.
9. Tiwari. S, "*Stevia rebaudiana*: a medicinal and nutraceutical plant and sweet gold for diabetic patients," *International Journal of Pharmacy and Life Sciences (IJPLS)*, vol. 1(8), pp. 451-457, 2010.
10. Vazquez-Hernandez. C, A.A. Feregrino-Perez, I. Perez-Ramirez, R.V. Ocampo-Velazquez, E. Rico-García, I. Torres-Pacheco, and R. G. Guevara-Gonzalez, "Controlled elicitation increases steviol glycosides (SGs) content and gene expression-associated to biosynthesis of SGs in *Stevia rebaudiana*," *Industrial Crops and Products*, vol. 139, p. 111479, 2019.
11. Woelwer-Rieck. U, C. Lankes, A. Wawrzun, and M. Wüst, "Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*," *European Food Research and Technology*, vol. 231(4), pp. 581-588, 2010.
12. Yadav. A. K, "A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]," *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 91(1), p. 1-27, 2011.
13. Zarei. A, Z. Zamani, A. Mousavi, R. Fatahi, M. K. Alavijeh, B. Dehsara, and S. A. Salami, "An effective protocol for isolation of high-quality RNA from pomegranate seeds," *Asian Aust J Plant Sci Biotechnol*, vol. 6, pp. 32-37, 2012.



هفتمین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران

