ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحه ۳۲۸ - ۳۱۹

شناسائی و توالی‌یابی ژن تلخی (*sgt1*) بادمجان (*Solanum melongena* L.)

Identification and sequencing of bitterness gene (*sgt1*) in eggplant (*Solanum melongena* L.)

محمود باقری[۱]، محمدرضا نقوی[۲]، محمدرضا حسندخت[۲]، علی‌اکبر شاه نجات بوشهری[۲*]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک دانشگاه تهران، مربی پژوهشی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- به‌ترتیب استاد، دانشیار، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

Bagheri M[1], Naghavi MR[2], Hasandokht MR[2], Shahnejat Bushehri AA[*2]

1- PhD Candidate of Molecular Genetics and Genetic Engineering at Tehran University and Instructor of Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2- Professor, Associate Professor, Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹٤/٤/١٦ - تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۵)

چکیده

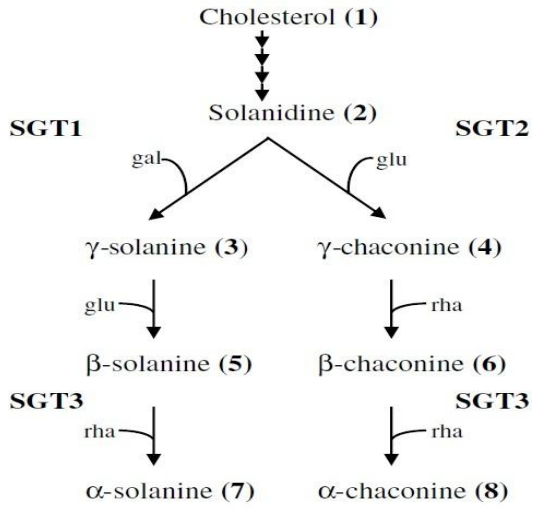
یکی از مهم‌ترین صفات نامطلوب بادمجان وجود تلخی در میوه‌های آن است که عمدتاً مربوط به وجود گلیکوآلکالویید سولاسونین می‌باشد. تولید و تجمع این ماده با اضافه‌شدن قند به آلکالویید سولاسودین توسط آنزیم‌های سولاسودین گلیکوزیل ترانسفراز (Solasodine glycosyltransferase) انجام می‌شود. این آنزیم در بادمجان شناسایی و خصوصیات آن تعیین شده ولی توالی ژن کدکننده آن مطالعه نشده‌است. بنابراین هدف از این مطالعه شناسایی و توالی‌یابی ژن کدکننده این آنزیم در بادمجان می‌باشد. در این مطالعه، توالی‌های مربوط به ژن *sgt1* در گونه‌های خویشاوند بادمجان از NCBI استخراج و با هم‌ردیفی آن‌ها نواحی حفاظت شده مشخص شد. واکنش‌های PCR بر روی DNA و cDNA با ترکیب‌های آغازگری مختلف منجر به تکثیر باندهایی با اندازه‌های مختلف بین حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز شد. تعدادی از این باندها پس از الکتروفورز، از روی ژل جدا و توالی‌یابی شدند. توالی‌های مربوطه بررسی و با حذف مناطق هم‌پوشان، توالی ناحیه کدکننده این ژن در بادمجان مشخص شد. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که توالی این ژن در بادمجان تشابه بالایی با توالی آن در سایر گیاهان خانواده Solanaceae از قبیل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و توتون دارد. دستیابی به توالی این ژن در بادمجان می‌تواند مقدمه‌ای برای انجام تحقیقات مشابه و دستیابی به توالی ژن‌های *sgt2* و *sgt3* شود. کاهش بیان و حتی خاموش‌کردن این ژن‌ها منجر به تولید ژنوتیپ‌های بادمجان با تلخی پایین‌تر و کیفیت به مراتب بالاتر خواهد شد.

واژه‌های کلیدی
بادمجان
تلخی
سولاسونین
sgt1

مقدمه

بادمجان (Eggplant) با نام علمی *Solanum melongena* L. یکی از گیاهان مهم خانواده Solanaceae می‌باشد. مجموع تولید بادمجان دنیا حدود ٤٥ میلیون تن است. چین، هند و جمهوری اسلامی ایران به‌ترتیب با ۲۸/۵، ۱۳/۵ و ۱/۵۳ میلیون تن رتبه‌های اول تا سوم تولید بادمجان دنیا را در اختیار دارند (FAO 2013). تلخی بادمجان یکی از صفات منفی بارز آن بوده و بسیاری از ژنوتیپ‌ها علی‌رغم داشتن صفات کمی و کیفی مناسب، تنها به دلیل تلخی بالا در مراحل ابتدایی اصلاحی حذف می‌شوند.

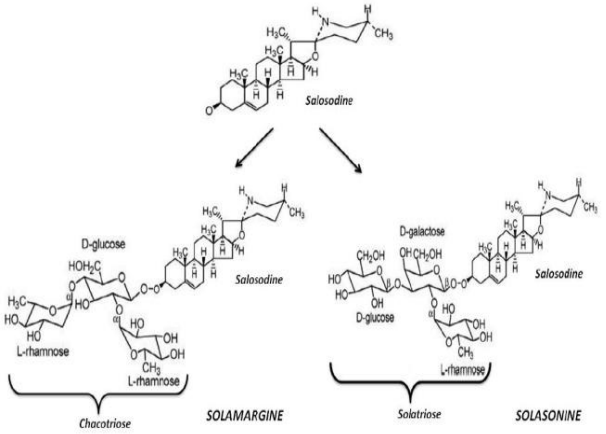
گیاهان تعداد زیادی ترکیبات آلی تولید می‌کنند که بعضاً به صورت متابولیت‌های اولیه و ثانویه طبقه‌بندی می‌شوند. در میان متابولیت‌های ثانویه بیش‌ترین مطالعات برروی گلیکوییدهای-استروییدی[1](SGAs) انجام شده‌است. این ترکیبات درگونه‌های خانواده Solanaceae از قبیل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و بادمجان مشاهده می‌شوند (Aubert et al. 1989). SGAs می‌توانند در تمام قسمت‌های گیاه یافت شوند ولی به‌طور خاص در قسمت‌های فعال از نظر متابولیکی از قبیل گل‌ها، میوه‌های نارس و شاخه‌ها و برگ‌های جوان یافت می‌شوند. ثابت شده که SGAs بین اندام‌های مختلف گیاهی منتقل نشده و وجود SGAs در هر اندام منحصر به تولید در آن‌جاست (Dinan et al. 2001). SGAs عمدتاً از دو آگلیکون[2] تشکیل یافته‌اند: سولاسیدان[3] و اسپیروسولان[4]. سولاسیدان، اصلی‌ترین آگلیکون بوده و آلکالوید سولانیدین[5] و گلیکوآلکالوییدهای سولانین[6] و چاکونین[7] (عمدتاً در سیب‌زمینی) از آن تشکیل می‌شوند. از آگلیکون اسپیروسولان، آلکالوییدهای سولاسودین[8] و توماتیدین[9] تشکیل می‌شوند که با گلیکوزیده شدن آن‌ها به ترتیب سولامارژین[10] و سولاسونین[11] از سولاسودین (عمدتاً در بادمجان)، و توماتین[12] از توماتیدین (عمدتاً در گوجه‌فرنگی) تشکیل می‌شوند (Friedman and McDonald 1997). SGAs ترکیبات مهم گیاهی علیه آفات و پاتوژن‌ها هستند و می‌توانند در سطوح بالا برای انسان سمی باشند (Ginzberg et al. 2009). یک تا دو میلی‌گرم SGAs به ازای هر کیلوگرم وزن انسان برای ایجاد مسمومیت در انسان کافی است (Dinan et al. 2001). SGAs در حین پخت از بین نمی‌روند (Smith et al. 1996). گلیکوآلکالوییدها باعث طعم تلخ میوه‌ها می‌شوند. اصلی‌ترین عامل تلخی میوه در بادمجان گلیکوآلکالوید سولاسونین است که از آلکالوید سولاسودین حاصل می‌شود. این ترکیب آنالوگ گلیکوآلکالوید سولانین در سیب‌زمینی و توماتین در گوجه‌فرنگی می‌باشد (Aubert et al. 1989). بررسی مسیر بیوسنتزی سولانین و چاکونین (شکل ۱) نشان می‌دهد که این گلیکوآلکالوییدهای استروییدی از کلسترول سنتز می‌شوند (Ziegler and Facchini 2008). کلسترول در بسیاری از گیاهان به میزان کمی وجود دارد ولیکن در مقادیر نسبتاً بالا (۱۵ تا ۲۰ درصد کل استرول‌ها) در گیاهان خانواده Solanaceae از قبیل سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) و توتون (*Nicotiana tabacum*) یافت می‌شود (Mohes et al. 1997).



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی سولانین و چاکونین در سیب‌زمینی (Arnqvist 2007)

[1] Steroidal glycoalkaloides
[2] Aglycone
[3] Solasidane
[4] Spirosolane
[5] Solanidine
[6] Solanine
[7] Chaconine
[8] Solasodine
[9] Tomatidine
[10] Solamargine
[11] Solasonine
[12] Tomatine

اضافه شدن قند به آگلیکون‌ها توسط آنزیم‌های SGT[1] انجام می‌شود. این آنزیم‌ها در برخی گیاهان مختلف شناسایی و ژن مربوطه همسانه‌سازی شده‌است. نزدیک‌ترین گیاه به بادمجان که ژن‌های *sgt* در آن همسانه‌سازی شده‌اند، سیب‌زمینی می‌باشد. از آنجا که هر کدام از این آنزیم‌ها قند خاصی را به آلکالویید اضافه می‌کنند، لذا با شماره‌گذاری از هم تفکیک می‌شوند. سه ژن پایین دستی سولانیدین در سیب‌زمینی همسانه‌سازی و مشخص شده‌اند. *Sgt1*، آنزیم گالاکتوزیل‌ترانسفراز را کد می‌کند که تبدیل سولانیدین به سولانین را کاتالیز می‌کند (McCue et al. 2003). *Sgt2* براساس همولوژی با *Sgt1* جداسازی و نشان داده شده که گلیکوزیل‌ترانسفراز را کد می‌کند که سنتز چاکونین از سولانیدین را کاتالیز می‌کند (McCue et al. 2006). به‌طور مشابه، *Sgt3* رامینول‌ترانسفراز را کد می‌کند که مرحله نهایی را در سنتز چاکونین و سولانین کاتالیز می‌نماید (McCue et al. 2007). در نتیجه آنزیم SGT1، گالاکتوز[2]، SGT2، گلوکز[3] و SGT3، رامنوز[4] را اضافه می‌کنند. این آنزیم‌ها در سیب‌زمینی، سولانیدین را به سولانین و چاکونین تبدیل می‌کنند (شکل ۱). مسیر آنالوگ در بادمجان تبدیل سولاسودین به سولانین و سولامارژین است (شکل ۲).



شکل ۲- مسیر بیوسنتزی سولاسونین و سولامارژین در بادمجان (Freidman 2006)

آنزیم سولاسودین‌گلیکوزیل‌ترانسفراز (SGT1) در بادمجان جداسازی و خصوصیات آن تعیین شده‌است (Potocka and Zimovski 2008). ولی برخلاف بسیاری از گیاهان که ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها همسانه‌سازی شده و حتی بعضاً در جهت کاهش میزان گلیکوآلکالوییدها نیز استفاده شده‌اند، توالی ناحیه کدکننده و همچنین توالی پروتیینی این آنزیم شناسایی نشده است. بنابراین هدف از انجام این تحقیق عبارت بود از شناسایی و توالی‌یابی ژن *sgt1* در بادمجان که علاوه بر افزایش اطلاعات در مورد ژن و پروتیین فرآورده (آنزیم)، امکان خاموش سازی یا کاهش بیان این ژن را نیز فراهم خواهد کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از رقم تجاری بادمجان بلک‌بیوتی[5] استفاده شد. کشت بذور و آماده‌سازی نشا در سینی‌های کشت با بستر کشت پیت‌موس و در شرایط کنترل‌شده گلخانه انجام پذیرفت. نشاهای بادمجان پس از ٤٥ روز به گلدان و همچنین به مزرعه انتقال یافتند. نمونه‌گیری از برگ‌های جوان بوته‌های بادمجان در مرحله رشد کامل و میوه‌دهی انجام پذیرفت. نمونه‌ها در داخل فویل آلومینیومی و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA و RNA ذخیره شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA با دستورالعمل مربوطه (بافر CTAB) انجام شد (Barra et al. 2012). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA (واکنش RT-PCR)

استخراج RNA از برگ‌های جوان بوته‌های بادمجان در مرحله رشد کامل و میوه‌دهی، با بافر ترایزول (RiboEx^{TM}) (شرکت GeneAll^{R} کره‌جنوبی) و ساخت cDNA (RT-PCR) با کیت سنتز AccuPower CycleScript PreMix with dN6 (شرکت BIONEER کره‌جنوبی) و دستورالعمل‌های مرتبط انجام شد.

[1] Steroid alkaloid glycosyltransferase
[2] Galactose
[3] Glucose
[4] Rhamnose
[5] Black beauty

کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به‌ترتیب با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

طراحی و سنتز آغازگر

در ابتدا توالی‌های موجود برای ژن *sgt1* در گونه‌های نزدیک به بادمجان شامل کدتوالی‌های[1] AY615272 سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)، EF011105 گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicon*)، AF494083 توتون (*Nicotiana benthamiana*) و AY899280 فلفل (*Capsicum annum*) از مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI[2]) استخراج شدند. همه این توالی‌ها مربوط به CDS بوده و لذا توالی mRNA بودند. با انجام هم‌ردیفی با نرم‌افزار DNAStar نواحی حفاظت شده مشخص شد (شکل ۳). توالی کامل این ژن (توالی DNA) در سیب‌زمینی شناسایی شده و این ژن دارای ۱۰ اگزون می‌باشد (Pajerowska et al. 2005) (شکل ٤). طراحی آغازگرها در نواحی حفاظت شده به گونه‌ای انجام شد که از هر اگزون فقط یک آغازگر طراحی شده و تمام طول یک آغازگر منحصراً بر روی یک اگزون باشد (جدول ۱). با بلاست[3] کردن ترکیب‌های آغازگری مختلف، جایگاه اتصال آغازگرها تایید شد و هم‌چنین اندازه مورد انتظار تکثیر قطعات در واکنش PCR با DNA و واکنش PCR با cDNA برای ژن *sgt1* به دست آمد (جدول ۲).

واکنش PCR

واکنش PCR بر روی DNA و هم‌چنین cDNA سنتزشده، با دستگاه PCR Biometra[R] T-Gradient Thermoblock (ساخت کشور آلمان) با حجم‌نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۷/۸ میکرولیتر آب‌مقطر استریل، ۲ میکرولیتر PCR Buffer 10X، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ 50 mM، ۲ میکرولیتر dNTPs 10 mM، ۲ میکرولیتر اسیدنوکلییک 10 mM، ۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو با غلظت 10 pmoles/µl و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک‌پلی‌مراز با غلظت 5u/µl انجام شد. شرایط انجام واکنش PCR شامل بازشدن رشته اولیه به مدت ٤ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۱ چرخه شامل ٤٥ ثانیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در دمای اتصال متناسب با جفت آغازگر هر واکنش جهت اتصال آغازگر و ۱۰۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آغازگر و در نهایت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط نهایی بود.

[1] Accession
[2] National center for biotechnology information
[3] Blast

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده در مناطق حفاظت شده براساس انجام هم‌ردیفی توالی ژن *sgt1*

علامت اختصاری آغازگر *	آغازگر**	توالی آغازگر (′۳→′۵)
1	sgt1-1F	TCT GGA GAC TAG GGG TAA AGA
2	sgt1-2F	AAG CTG TTG TTG ATG CGA ACA
3	sgt1-3F	AAC TGG TGC TAG TTT AGC
4	sgt1-4F	GAC AAT GTT GCT ATT GCG CC
5	sgt1-5F	ATA CCA GCC AAG AAT GTT GTT
6	sgt1-6R	ACC TAG GCT GGA AAG AAT AAG
7	sgt1-7R	CAT TTT GCA GGT GTT ATC TT
8	sgt1-8R	GAG GAA GGA TAA CTG GGC C
9	sgt1-9R	GCA TCT CCA TCC AAT TTT TC
10	sgt1-10R	TTC TTT GTG CCA ACT TCT TTC

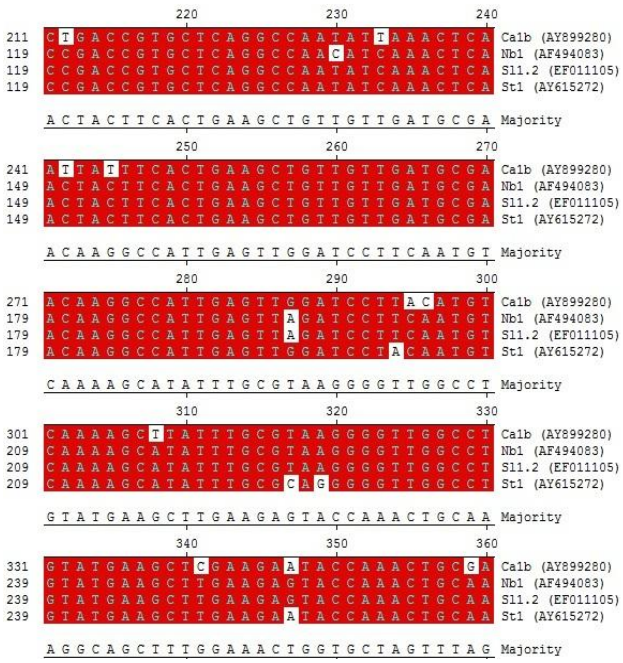
* علامت اختصاری نشان‌دهنده شماره اگزونی است که آغازگر از آن منطقه طراحی شده‌است.

**علامت F نشان‌دهنده آغازگر پیش‌رو و علامت R نشان‌دهنده آغازگر پس‌رو می‌باشد.

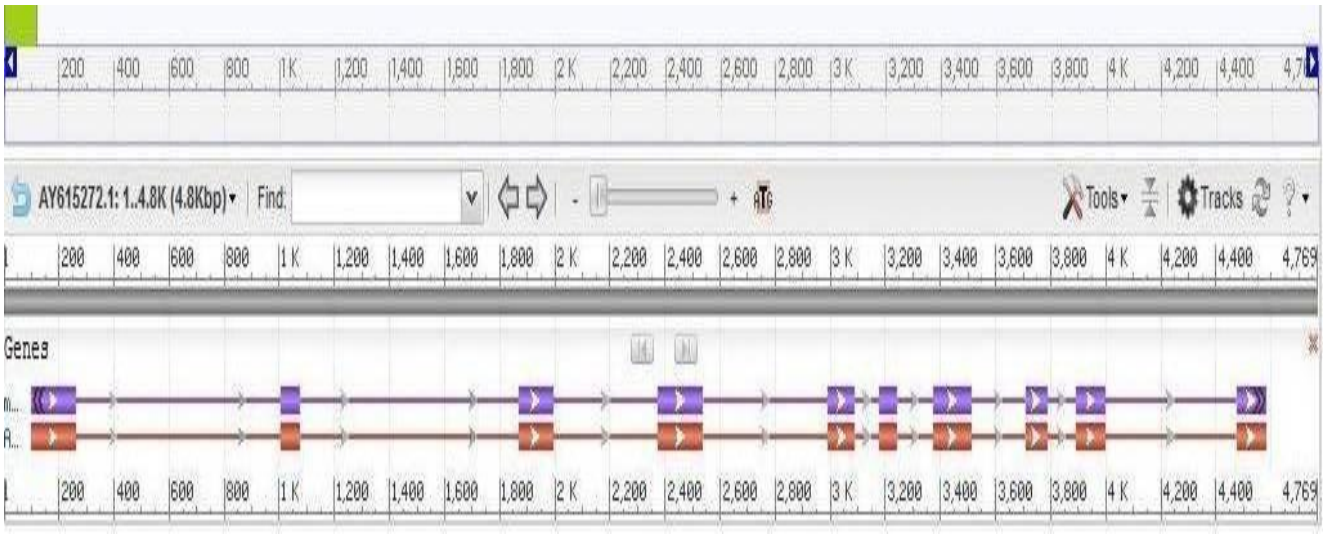
جدول ۲- اندازه محصول واکنش PCR با DNA و cDNA بادمجان براساس بلاست ترکیب‌های آغازگری مختلف

اندازه محصول واکنش PCR با cDNA (bp)	اندازه محصول واکنش PCR با DNA (bp)	دمای اتصال جفت آغازگر (°C)	علامت اختصاری روی تصاویر ژل*	آغازگر پس‌رو	آغازگر پیش‌رو
659	2962	55	1 × 6	Sgt1-6	Sgt1-1
687	3145	55	1 × 7	Sgt1-7	Sgt1-1
837	3465	58	1 × 8	Sgt1-8	Sgt1-1
1085	3650	55	1 × 9	Sgt1-9	Sgt1-1
1176	4245	55	1 × 10	Sgt1-10	Sgt1-1
510	2283	60	2 × 6	Sgt1-6	Sgt1-2
588	2395	58	2 × 7	Sgt1-7	Sgt1-2
758	2623	58	2 × 8	Sgt1-8	Sgt1-2
869	2800	58	2 × 9	Sgt1-9	Sgt1-2
1045	3400	60	2 × 10	Sgt1-10	Sgt1-2
389	1313	55	3 × 6	Sgt1-6	Sgt1-3
457	1486	55	3 × 7	Sgt1-7	Sgt1-3
567	1732	57	3 × 8	Sgt1-8	Sgt1-3
648	1913	56	3 × 9	Sgt1-9	Sgt1-3
780	2508	56	3 × 10	Sgt1-10	Sgt1-3
235	720	57	4 × 6	Sgt1-6	Sgt1-4
263	878	57	4 × 7	Sgt1-7	Sgt1-4
413	1220	60	4 × 8	Sgt1-8	Sgt1-4
494	1405	58	4 × 9	Sgt1-9	Sgt1-4
678	2052	58	4 × 10	Sgt1-10	Sgt1-4
97	185	55	5 × 6	Sgt1-6	Sgt1-5
125	343	55	5 × 7	Sgt1-7	Sgt1-5
275	689	57	5 × 8	Sgt1-8	Sgt1-5
356	874	55	5 × 9	Sgt1-9	Sgt1-5
488	1468	55	5 × 10	Sgt1-10	Sgt1-5

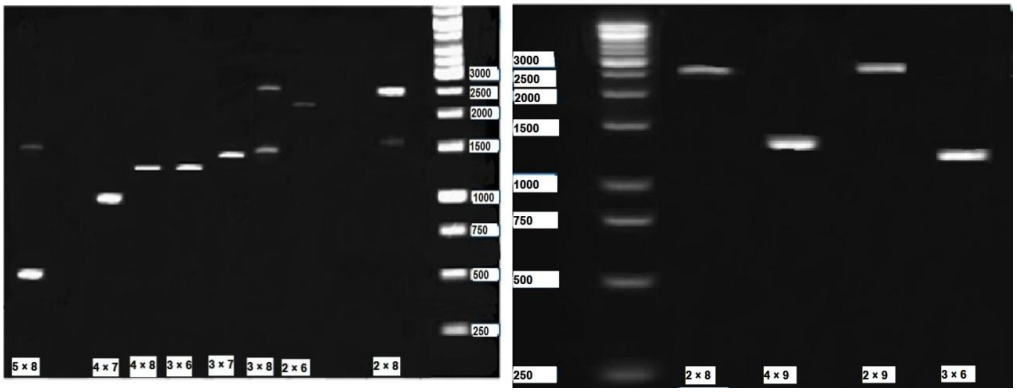
* آغازگرهای مورد استفاده در واکنش، عدد اول شماره آغازگر پیش‌رو و عدد دوم شماره آغازگر پس‌رو می‌باشد.



شکل ۳- بخشی از نتایج هم‌ردیفی ژن‌های *sgt1* در گیاهان خانواده Solanaceae جهت تشخیص مناطق حفاظت شده



شکل ٤- نواحی اگزونی و اینترونی ژن *sgt1* در سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)



شکل ٥- الکتروفورز ژل آگارز محصولات واکنش PCR برای DNA بادمجان با ترکیبات مختلف آغازگرها (شماره‌های هر چاهک معرف آغازگرهای واکنش مربوطه براساس جدول شماره ۲ می‌باشد)

فرآورده‌های واکنش PCR همراه با Ladder 1kb (Fermentas) برروی ژل آگارز دو درصد (Merck) تفکیک شد و پس از انجام الکتروفورز در دستگاه عکسبرداری از ژل (ساخت کشور فرانسه) مشاهده، عکس‌برداری و بررسی شدند. در واکنش‌های PCR انجام شده با cDNA، به منظور بهبود وضوح باندها و افزایش غلظت قطعات تکثیر شده جهت توالی‌یابی مطلوب قطعات، این باندها از ژل جدا شده و قطعات تکثیرشده با استفاده از کیت Gel AccuPrep^{R} Purification kit Cat.No.K-3035-1 (BIONEER کره‌جنوبی) از ژل آگارز تخلیص و واکنش PCR مجدد برروی آن‌ها انجام شد. باندهای تکثیر شده مورد نظر مجدداً از ژل آگارز جدا و جهت توالی‌یابی به شرکت‌های تکاپوزیست و سیناکلون فرستاده شدند. نتایج حاصل بررسی و با حذف مناطق هم‌پوشان توسط نرم‌افزار GAP3، یک توالی کامل از ژن موردنظر به دست آمد. نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعات و هم‌چنین توالی کامل حاصله بلاست شدند. هم‌چنین هم‌ردیفی[1] هر یک از این توالی‌ها با توالی CDS ژن *sgt1* در گونه‌های خویشاوند بادمجان (سیب-زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و توتون) با نرم‌افزارهای EBI و Softberry انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار ExPASy ترجمه پروتیینی این توالی نیز مشخص شد. هم‌ردیفی توالی پروتیینی حاصل نیز با استفاده از نرم‌افزار NCBI protein blast انجام شد.

[1] Local Pairwise Alignment

نتایج و بحث

شناسایی و توالی‌یابی یک ژن جدید در یک گونه که قبلاً در سایر گونه‌های خویشاوند شناسایی شده، با استفاده از انجام هم‌ردیفی در گونه‌های قبلی، طراحی آغازگر، انجام واکنش‌های PCR و مطالعه باندها و همچنین توالی‌یابی آن‌ها روشی مطمئن و در عین حال میان‌بر است که بارها توسط محققین مختلف انجام و به نتیجه رسیده است. Chaturvedi et al. (2012) جهت شناسایی ژن‌های *sgt* در *Withania somnifera* آغازگرهایی بر اساس نواحی حفاظت شده این ژن‌ها در *Arabidopsis thaliana*، *Avena sativa*، *Candida albicans*، *Pichia pastoris* و *Sacharomyces cerevisiae* طراحی و با انجام واکنش PCR بر روی cDNA موفق به شناسایی و توالی‌یابی این ژن‌ها شدند. Shibuya et al. (2010) نشان دادند که آنزیم‌های SGT سویا (*Glycine max*) (GmSGT2 و GmSGT3) به‌ترتیب با اضافه کردن قندهای گلوکز و رامنوز به آلکالویید سویاساپوژنول[1] باعث تولید و تجمع گلیکوآلکالویید سویاساپونین I[2] می‌شوند. این محققین با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن *sgt* در آرابیدوپسیس و انجام واکنش PCR توالی ژن‌های کدکننده مربوطه را نیز به‌دست آوردند.

در واکنش‌های PCR انجام شده بر روی DNA بادمجان، باندهایی تکثیر شدند که اندازه آن‌ها با اندازه مورد انتظار برای ژن *sgt1* در DNA سیب‌زمینی (با توجه به بلاست‌کردن ترکیب آغازگری واکنش و تعیین جایگاه اتصال در NCBI) مطابقت داشت (جدول ۲ و شکل ۵). این بررسی برای اکثر ترکیب‌های آغازگری شامل sgt1-5F و sgt1-8R (۸×۵)، sgt1-4 و sgt1-7 (۷×۴)، sgt1-4 و sgt1-8 (۸×۴)، sgt1-3 و sgt1-6 (۶×۳)، sgt1-3F و sgt1-7R (۷×۳)، sgt1-4F و sgt1-9R (۹×۴)، و sgt1-2F و sgt1-9F (۹×۲) انجام و تطابق مذکور تایید شد.

کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین باندهای تکثیر شده مربوط به ترکیب‌های آغازگری sgt1-5F و sgt1-6R (۶×۵) و sgt1-2F و sgt1-9F (۹×۲) به‌ترتیب با اندازه حدوداً ۲۰۰ و ۳۰۰۰ جفت‌باز بود. در باندهای تکثیرشده حاصل از PCR بر روی DNA بادمجان، فقط باند ۲۰۰ جفت‌بازی توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که اندازه این قطعه ۱۸۵ جفت‌باز است و بخش‌هایی از اگزون‌های پنج و شش و هم‌چنین اینترون بین این دو اگزون را در بر دارد. بلاست این توالی با توالی نوکلئوتیدی خانواده Solanaceae در NCBI تطابق[3] ۹۳ تا ۹۷ درصدی با Evalue بین 2×10^{-14} تا 1×10^{-61} با توالی ژن *sgt1* در گونه‌های مختلف این خانواده را نشان داد. انجام هم‌ردیفی این توالی با توالی ژن *sgt1* سیب‌زمینی توسط نرم‌افزار EBI و Softberry نیز تشابه[4] ۸۴ درصدی را تایید کرد.

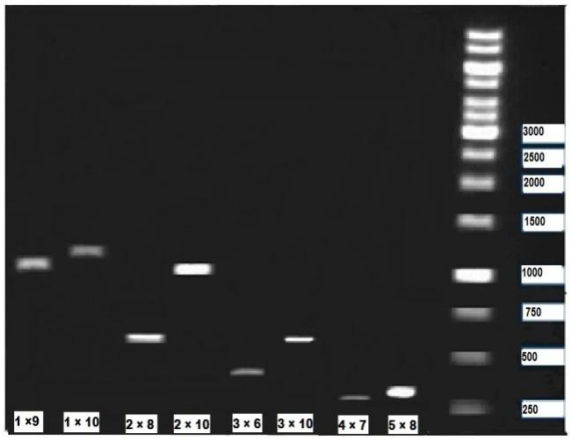
الکتروفورز قطعات تکثیرشده مربوط به واکنش PCR با cDNA بادمجان نشان می‌دهد که تمامی باندهای مشاهده شده انطباق بسیار مناسبی با اندازه CDS ژن *sgt1* در سایر گیاهان خانواده Solanaceae (سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و توتون) داشتند (جدول ۲ و شکل ٦). قطعات تکثیرشده (باندها) از ژل جداسازی، تخلیص و PCR مجدد انجام شد که در نتیجه با بالارفتن ضریب تکثیر، باندهای واضح‌تری مشاهده شد. توالی‌یابی قطعات حاصل از تکثیر مجدد، اطلاعات ارزشمندی را در مورد توالی ژن *sgt1* در بادمجان ارایه کرد. بلاست نتایج حاصل از توالی‌یابی این قطعات تطابق بالای (۷۸ تا ۹۷ درصدی) با توالی CDS ژن *sgt1* در سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، توتون و فلفل نشان داد. با کنار هم قرار دادن این توالی‌ها و حذف مناطق هم‌پوشان، یک توالی شامل ۱۲۰٦ نوکلئوتید به‌دست آمد که در واقع مربوط به توالی ناحیه کدکننده این ژن در بادمجان می‌باشد (شکل ۷). بلاست توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده با توالی نوکلئوتیدی خانواده Solanaceae در NCBI تطابق ۷۸ تا ۹۲ درصدی این توالی با توالی ژن *sgt1* در سایر گیاهان این خانواده با Evalue بین صفر تا 7×10^{-51} را نشان داد. بلاست توالی حاصله با توالی نوکلئوتیدی بادمجان (*Solanum melongena* L.) هیچ نتیجه‌ای در بر نداشت که نشان داد تاکنون هیچ توالی نوکلئوتیدی مشابهی در بادمجان با توالی حاصله در این تحقیق در NCBI ثبت نشده است. انجام هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده با توالی این ژن در گیاهان خویشاوند بادمجان توسط نرم‌افزار EBI و

[1] Soyasapogenol
[2] Soyasaponin I
[3] Identity
[4] Similarity

Softberry تشابه ۸۵/۷، ۸۷/۱، ۸٤/۷ و ۸۷/۵ درصدی را به‌ترتیب با توالی CDS ژن *sgt1* در سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و توتون (کدتوالی‌های مورد استفاده جهت طراحی آغازگر در این تحقیق) نشان داد. انجام هم‌ردیفی چندگانه در نرم‌افزار DNAStar نشان داد که این توالی در نواحی حفاظت شده کاملاً منطبق با چهار توالی مذکور بوده و اختلافات موجود مربوط به نواحی غیرحفاظت شده می‌باشد.

ترجمه این CDS نیز نشان‌دهنده یک پروتیین کامل از شروع تا انتها می‌باشد که متشکل از ٤٠٢ اسیدآمینه است (شکل ۸). بلاست توالی اسیدآمینه‌ای حاصل با توالی پروتیینی خانواده Solanaceae در NCBI تطابق ٦١ تا ٧٦ درصدی این توالی با توالی آنزیم SGT1 در سایر گیاهان این خانواده با Evalue بین صفر تا 2×10^{-65} را نشان داد. بلاست توالی حاصله با توالی اسیدآمینه‌ای بادمجان (*Solanum melongena* L.) هیچ نتیجه‌ای در بر نداشت که نشان داد تاکنون هیچ توالی پروتیینی مشابهی در بادمجان با توالی حاصل از این تحقیق در NCBI ثبت نشده‌است. انجام هم-ردیفی توالی اسیدآمینه‌ای حاصل با توالی آنزیم SGT1 در گیاهان خویشاوند بادمجان توسط نرم‌افزار EBI و Softberry تشابه ۷۹/۱، ۸۰/٦، ۷۹/٦ و ۸۱/۸ درصدی را به‌ترتیب با توالی CDS ژن *sgt1* در سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و توتون (نمونه‌های مورد استفاده جهت طراحی آغازگر در این تحقیق) نشان داد.

با توجه به نتایج حاصل از تکثیر قطعات در آزمایشات PCR انجام شده با انواع ترکیب‌های آغازگری و تطابق اندازه باندهای تکثیرشده در واکنش‌های مختلف با اندازه‌های موردانتظار (جدول ۲ و شکل ۵) و همچنین توالی‌یابی قطعات تکثیرشده، مشخص شد که این ژن در بادمجان وجود دارد و توالی آن نیز بسیار نزدیک به توالی این ژن در سایر گیاهان خانواده Solanaceae می-باشد. از طرف دیگر با توجه به اینکه آغازگرها از نواحی حفاظت‌شده طراحی شده بودند و همه این آغازگرها نیز منجر به تکثیر شدند به احتمال بسیار بالا این نواحی در ژن *sgt1* بادمجان نیز نواحی حفاظت‌شده می‌باشند که انجام هم‌ردیفی چندگانه توالی به‌دست آمده و توالی‌های اولیه در نرم‌افزار DNAStar موید این مطلب بود. با توجه به بررسی مقالات مرتبط، این اولین بار است که وجود این ژن در بادمجان گزارش می‌شود، هر چند آنزیم سولاسودین‌گالاکتوزیل ترانسفراز (SGT1) در بادمجان جداسازی و شناسایی شده بود (Potocka and Zimovski 2008)، ولی هیچ مدرکی دال بر شناسایی ژن کد کننده این آنزیم در مرور مقالات مشاهده نشده‌است.



شکل ٦- الکتروفورز ژل آگارز محصولات واکنش PCR با cDNA بادمجان و ترکیبات مختلف آغازگری (شماره‌های هر چاهک معرف آغازگرهای واکنش مربوطه براساس جدول شماره ۲ می‌باشد)

ATGGCGTCCGATCTGGAGACTAGGGCTAAAGAACTCTT
AGCGTTCATCGATGACCACTTTGAACTCGCCGTTGACCT
TTACACTCAAGCCATAACGATGAGTCCTAAGAACCGTG
AGCTTTTCGCTGACCGTGCTCAGGCCAACATCAAACTC
AACTACTTCACTGAAGCTGTTGTTGATGCGAACAAGGC
CCGTATTGAGCTTAGATCCTACAAGATGTCAAAAGCAT
ATAGCTTGCGCAGGGGGTTGGCCTGTATGATTCAAGAG
CTCGAAGAGTACCAAACTGCAAAAGCAGCTTTGCAAAC
TGGTGCTAGTTTAGCTGTACCGGCAGAGTCTAGGTTCA
CAAAGTTTAATCAAAGGAATGTGATGAACGCATCAATT
GCAGAGGAAGCGTTTTCTGGAGAACTGCCTAATCAGGT
TGGAGATTCAGTGGATAAAACCTCGGGAAATGTCCATG
TTGCGTCTCCTGCATCTGAGTCTTCGGACAATGTTGCTA
TTGCGCCTAGAGATCCTCAACCAACTGTTCTGCTCAACC
TGTCCTATCAAGGATCTGCTGCCAGAATGCCAAAATAC
AGGCATGAGTTTTATCAGAAGCCAGAGGAGGTGGTGGT
GACCATATTTGCCAAGGGTATACCAGCCAAGAATGTTG
TTATTGACTTTGGTGAACAAATACTTAGTGTTAGCGCAT
TGATGTGCCGCGCGGGCGAAGAAACTTATTCTTTCCAG
CCTAGGAAGGCCGGCCATAAGATAACACCTGCAAAATG
CAGATATGAAGTAATGTCCACCAATATGGTAATTGAGA
GGATCCGCCTTGCGAAAGCTGAACCTTTACACTGGACA
TCTCTGGATTATACGACAGAATCTGCTGTAATGCAGAG
GCCTAATGTGTCATCAGATGCCCCGCGGCCCAGTTATC
CTTCCTCGAAACTGAGACACGTGGATTGGGATAAATTA
GCGATCAAGCTGaAGGTGAAAAAGGAGGAAAAAGATG
AAAAATTGGATGGAGATGCAGCATTGAACAAATTTTTC
CGAGACATTTACATTTGCGAAGACGCCGATGAGGACAC
CAGAAGAGCCATGATTACGAAATCCTTTGTGGAATCTA
ATGGTCCGACTGTTTTGTCCACAAACTGGAAAGAAGTT
GGCACAAAGAAGGTCGAAGGAAGCCCTCCAGATGGCA
TGGAGTTGAAGAAATGGGAGATCTAG

شکل ۷- توالی ناحیه کدکننده ژن *sgt1* در بادمجان

Met A S D L E T R A K E L L A F I D D H F E L A V D L Y T
Q A I T Met S P K N R E L F A D R A Q A N I K L N Y F T E
A V V D A N K A R I E L R S Y K Met S K A Y S L R R G L A
C Met I Q E L E E Y Q T A K A A L Q T G A S L A V P A E S
R F T K F N Q R N V Met N A S I A E E A F S G E L P N Q V
G D S V D K T S G N V H V A S P A S E S S D N V A I A P R
D P Q P T V L L N L S Y Q G S A A R Met P K Y R H E F Y Q
K P E E V V V T I F A K G I P A K N V V I D F G E Q I L S V
S A L Met C R A G E E T Y S F Q P R K A G H K I T P A K C
R Y E V Met S T N Met V I E R I R L A K A E P L H W T S L
D Y T T E S A V Met Q R P N V S S D A P R P S Y P S S K L
R H V D W D K L A I K L K V K K E E K D E K L D G D A A
L N K F F R D I Y I C E D A D E D T R R A Met I T K S F V E
S N G P T V L S T N W K E V G T K K V E G S P P D G Met E
L K K W E I Stop

شکل ۸- توالی پروتیینی (اسیدآمینه‌ای) آنزیم SGT1 در بادمجان

انتساب توالی به‌دست آمده به ژن و آنزیم و بررسی رابطهٔ بیان ژن مورد بررسی با میزان تولید گلیکوآلکالویید سولاسونین در اندام‌ها و مراحل مختلف رشدی بادمجان با روش HPLC و Real Time PCR مطمئن‌تر است (Ritchie et al. 2008; Mweetwa 2009; Renata et al. 2012; Sana et al. 2015).

القای خاموشی موقت این ژن به کمک ویروس[1] و عدم تولید سولاسونین به‌طور قطع ثابت خواهد کرد که توالی به‌دست آمده مربوط به ژن *sgt1* می‌باشد (Liu et al. 2012).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، می‌توان با انجام مطالعات مشابه، توالی ژن‌های *sgt2* و *sgt3* بادمجان را نیز شناسایی کرد. ژن‌های *sgt2* و *sgt3* سیب‌زمینی نیز بر اساس همولوژی آن‌ها با ژن *sgt1* سیب‌زمینی شناسایی شده‌اند (Mccue et al. 2006; Mccue et al. 2007). علاوه بر این، امکان مطالعه ژنوتیپ‌های دیگر بادمجان و دستیابی به توالی آلل‌های احتمالی دیگر این ژن‌ها نیز وجود دارد. McCue et al. (2011) با استفاده از روشی مشابه، دو آلل جدید *sgt2.1* و *sgt2.2* را در سیب‌زمینی شناسایی و توالی‌یابی کردند. وجود این دو آلل قبلاً با آنالیز cDNA و اطلاعات EST سیب‌زمینی از TIGR[2] ثابت شده بود (McCue et al. 2006).

تاکید می‌شود که در بین سه ژن *sgt1*، *sgt2* و *sgt3*، ژن *sgt1* اهمیت بسیار بیشتری دارد. این ژن آنزیم SGT1 را کد می‌کند که با اضافه کردن گالاکتوز به آلکالویید سولاسودین تولید گلیکوآلکالویید سولاسونین (اصلی‌ترین عامل تلخی میوه بادمجان) را کنترل می‌کند.

نتایج این تحقیق به‌عنوان نقطه شروع پژوهش در مسیری است که می‌تواند منجر به شناسایی و توالی‌یابی ناحیه کدکننده آنزیم SGT1 در بادمجان شود. با انجام پروژه‌های تکمیلی، توالی‌یابی کامل این ژن و هم‌چنین ژن‌های ارتولوگ در بادمجان امکان‌پذیر خواهد بود. کاهش بیان و حتی خاموش‌کردن این ژن‌ها منجر به تولید ژنوتیپ‌های بادمجان با تلخی پایین و کیفیت بالاتر خواهد شد که از نقطه نظر تجاری بسیار ارزشمند می‌باشد. McCue et al. (2003) با کاهش بیان این ژن در سیب‌زمینی میزان تولید سولانین را تا ۴۰ درصد کاهش دادند.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر انجام شده‌است. بدین‌وسیله از آقایان دکتر گودرز نجفیان، دکتر علی مقدم و مهندس ماهیار عابدی تشکر می‌شود. از آقایان دکتر مهدی رضایی، دکتر رحمت محمدی، مهندس حسن حسن-آبادی و مهندس محمدجواد زمانی به دلیل راهنمایی‌های علمی و ارزشمند ایشان در انجام مراحل مختلف این تحقیق تشکر ویژه به عمل می‌آید.

[1] Virus induced gene silencing

[2] The institute for genomic research

منابع

Barra M, Salazar E, Beltran M, Sagredo B (2012) Simple and robust DNA extraction method for the large-scale analysis of genotypes containing high polyphenolic content, such as landraces of *Solanum tuberosum* and *Zea mays*. Ciencia e Investigacion Agraria 39: 593-601.

Chaturvedi P, Mishra M, Akhtar N, Gupta P, Mishra P, Tuli R (2012) Sterol glycosyltransferases-identification of

Arnqvist L (2007) Plant sterol metabolism with emphasis on glycoalkaloid biosynthesis in potato. Uppsala University, Sweden.

Aubert S, Daunay MC, Pochard E (1989) Saponins and steroidal alkaloids of eggplant (*Solanum melongena*). I. Foodinterest, analytical methods, and localization in fruit. Agronomie 9: 641-651.

members of gene family and their role in stress in *Withania somnifera*. Molecular Biology Reports 39: 9755-9764.

Dinan L, Harmatha J, Lafont R (2001) Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. Journal of Chromatography A 935: 105-123.

FAO (2013) FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx. FAO, Rome, Italy.

Friedman M (2006) Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 8655-8681.

Friedman M, McDonald GM (1997) Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. Critical Reviews in Plant Science 16: 55-132.

Ginzberg I, Tokuhisa JG ,Veilleux RE (2009) Potato steroidal glycoalkaloids: biosynthesis and genetic manipulation. Potato Research 52: 1-15.

Liu H, Fu D, Zhu B, Yan H**,** Shen X, Zuo J, Zhu Y, Luo Y (2012). Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*). Journal of Integrative Plant Biology 54: 422-429.

McCue KF, Corsini DL, Allen PV, Rockhold DR, Maccree MM, Shepherd LVT, Moehs CP, Joyce P, Davies H. Belknap WR (2003) Reduction of total steroidal glycoalkaloids in potato tubers using antisense constructs of a gene encoding a solanidine glucosyl transferase. Acta Horticulture 619: 77-86.

McCue KF, Allen PV, Shepherd LVT, Blake A, Whitworth J, Maccree MM, Rockhold DR, Stewart D, Davies H, Belknap WR (2006) The primary in vivo steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato (*Solanum tuberosum*). Phytochemistry 67: 1590-1597.

McCue KF, Allen PV, Shepherd LVT, Blake A, Maccree MM, Rockhold DR, Novy RG, Stewart D, Davies HV, Belknap WR (2007) Potato glycosterol rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis. Phytochemistry 68: 327-334.

McCue KF, Rockhold DR, Chhan A, Belknap WR (2011) Structure of Two *Solanum tuberosum* Steroidal Glycoalkaloid Glycosyltransferase Genes and Expression of their Promoters in Transgenic Potatoes. American Journal of Potato Research 88: 485-492.

Moehs CP, Allen PV, Friedman M, Belknap WR (1997) Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. Plant Journal 11: 227-236

Mweetwa AM (2009) Biosynthesis of Steroidal Glycoalkaloids in *Solanum chacoense* Bitter. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.

Pajerowska KM, Parker JE, Gebhardt C (2005) Potato homologs of *Arabidopsis thaliana* genes functional in defense signaling--identification, genetic mapping, and molecular cloning. Molecular Plant Microbe Interaction Journal 18: 1107-19.

Potocka A, Zimowski J (2008) Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 1. UDP-glucose : sterol glucosyltransferase. Acta Biochimica Polonica, 55: 127-134.

Renata F JT, Juliana CDC, Mariza AM, Fabíola SGP, Maria VLBB, Jairo KB, James DM (2012) A validated HPLC analytical method for the analysis of solasonine and solamargine in *in vitro* skin penetration studies**.** Química Nova 35: 576-583.

Ritchie C E, Neslihan T, Oykum K, Anne F, Sami D, Adelia E A (2008). Development of Practical HPLC Methods for the Separation and Determination of Eggplant Steroidal Glycoalkaloids and their Aglycones. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 31: 984-1000.

Sana SA, Elsadig AE, Kamal YT, Masood SK, Sayeed A (2015) Variations in the cytotoxic glycoalkaloids solamargine and solasonine in different parts of the *Solanum incanum* plant during its growth and development in Oman. Journal of Taibah University Science. Available at http://www.journals.elsevier.com/journal-of-taibah-university-for-science.

Shibuya M, Nishimura K, Yasuyama N, Ebizuka Y (2010) Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max*. FEBS Letters 584: 2258-2264.

Smith DB, Roddick JG, Jones JL (1996) Potato glycoalkaloids: some unanswered questions. Trends Food Science Technology 7: 126-131.

Ziegler J, Facchini PJ (2008) Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. Annual Review of Plant Biology 59: 735-769.

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

Identification and sequencing of bitterness gene (*sgt1*) in eggplant (*Solanum melongena* L.)

Bagheri M[1], Naghavi MR[2], Hasandokht MR[2], Shahnejat Bushehri AA[*2]

1. PhD Candidate of Molecular Genetics and Genetic Engineering at Tehran University and Instructor of Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Professor, Associate Professor, Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
* Corresponding Author, Email: ashah@ut.ac.ir

A B S T R A C T

One of the undesirable traits in eggplant is the bitterness of fruits. Eggplant specific piquant and bitter taste is mainly due to the presence of solasonine glycoalkaloid. Solasonine is generated and accumulated by adding sugars to solasodine alkaloid by solasodine glycosyltransferase (SGT) enzymes. These enzymes have been purified and characterized in eggplant, but the encoding genes have not been identified before. In this study, *sgt1* gene sequences in solanaceae family were collected and conserved sites were specified by multi-alignment and proper primers were designed. DNA and RNA extraction and cDNA synthesis were conducted by related protocols. PCR reactions for DNA and cDNA, with different combinations of the designed primers, lead to amplification of various bands in different sizes between 200 to 3000 bp. These fragments were separated and sequenced. The obtained sequences were assayed and by elimination of overlap sites, sequences of encoding site of this gene were achieved. Bioinformatics' analysis illustrated high similarity between our got sequence and *sgt1* gene sequences in other species of solanaceae family such as potato, tomato, pepper, and tobacco. Access to the sequence of *sgt1* gene in eggplant can be a preliminary to similar studies and attainment to *sgt2* and *sgt3* sequences. Down expressing and silencing of these genes would result production of new eggplant genotypes with less bitterness and better quality.

Key Words

bitterness, eggplant, *sgt1*, solasonine